

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE LA TOXICITÉ DES MÉDICAMENTS POSICOR ET MINTEZOL EN
CULTURE PRIMAIRE D'HÉPATOCYTES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
MARILYNE SÉÏDE

JANVIER 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

À la mémoire de ma grand-mère maternelle, Élicide Placide, qui nous a quittés il y a peu de temps, mais qui veille sur moi de là-haut.

À la mémoire de mes ancêtres, dont la fierté et la force de caractère vivent toujours en moi.

REMERCIEMENTS

Je remercie ma directrice, le Dr. Diana Averill, de m'avoir attribué ce projet, de m'avoir dirigée dans sa réalisation et d'avoir révisé mon mémoire.

Un grand merci également à mon co-directeur, le Dr. Mircea Alexandru Mateescu, en particulier pour ses judicieux conseils et pour avoir reconnu mes qualités.

Merci à mes collègues de laboratoire, plus particulièrement Michel Marion, André Tanel et Ahmed Bettaieb pour leur aide dans certaines techniques.

Merci également aux organismes subventionnaires CRSNG-INNOV, la Gestion Valeo et Valorisation Recherche Québec (VRQ), pour le financement du projet.

Je remercie aussi de tout cœur mes parents, Antoine Séide et Lucienne Nicolas, pour leur amour, leur dévotion à mon bonheur et à mon bien-être, ainsi que pour leur écoute et leurs précieux conseils.

Merci aussi à mon grand frère, Stéphane Séide, alias «Swifty Swift», dont je sais toujours qu'il est fier de moi sans même qu'il ait à me le dire.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
RÉSUMÉ	xv
 PREMIÈRE PARTIE : INTRODUCTION	 1
 CHAPITRE I LE FOIE	 1
1.1 Généralités.....	1
1.2 Histologie du foie.....	1
1.2.1 Organisation structurelle.....	1
1.2.2 Apport sanguin.....	3
1.2.3 Cellules composant le foie.....	5
1.3 Fonctions hépatiques.....	7
1.3.1 Fonction biliaire des hépatocytes.....	7
1.3.2 Fonctions métaboliques des hépatocytes.....	8
1.3.3 Fonction de biotransformation des hépatocytes.....	9
 CHAPITRE II MÉTABOLISME DES XÉNOBIOTIQUES	 10
2.1 Généralités	10
2.2 Les 5 phases du métabolisme	11
2.2.1 Métabolisme de phase 0.....	11
2.2.2 Métabolisme de phase 1.....	12

2.2.3 Métabolisme de phase 2.....	18
2.2.4 Métabolisme de phase 3 et 4.....	19
2.3 Bioactivation	19
CHAPITRE III	
MORT CELLULAIRE	21
3.1 Généralités sur l'apoptose.....	21
3.2 Apoptose versus nécrose.....	21
3.3 Les caspases.....	23
3.3.1 Généralités.....	23
3.3.2 Structure et activation des caspases.....	24
3.4 Voies d'activation des caspases.....	26
3.4.1 La voie mitochondriale.....	26
3.4.2 La voie des récepteurs de mort.....	27
3.4.3 Le pont entre la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale....	28
CHAPITRE IV	
HÉPATOTOXICITÉ DES MÉDICAMENTS	30
4.1 Généralités	30
4.2 L'hépatotoxicité médicamenteuse : prévisible ou imprévisible.....	30
4.3 Les différentes formes d'hépatopathies médicamenteuses.....	31
4.4 Surdoses médicamenteuses.....	33
4.5 Insuffisance hépatique.....	34
4.5.1 Généralités.....	34
4.5.2 Les différentes causes d'insuffisance hépatique aiguë.....	34
4.6 Interactions médicamenteuses pharmacocinétiques.....	35
CHAPITRE V	
MÉTABOLISME ET HÉPATOTOXICITÉ DES MÉDICAMENTS ÉTUDIÉS : LE TYLÉNOL ^{MD} , LE MINTEZOL ^{MD} ET LE POSICOR ^{MD}	36
5.1 Tylénol ^{MD}	36

5.1.1 Généralités	36
5.1.2 Métabolisme	37
5.1.3 Mécanisme d'hépatotoxicité	38
5.2 Mintezol ^{MD}	41
5.2.1 Généralités	41
5.2.2 Métabolisme et mécanisme d'hépatotoxicité	42
5.3 Posicor ^{MD}	45
5.3.1 Généralités.....	45
5.3.2 Métabolisme	47
5.3.3 Mécanisme d'hépatotoxicité.....	47
CHAPITRE VI	
MODÈLE D'ÉTUDE.....	49
6.1 Modèle d'étude <i>in vitro</i>	49
6.2 Choix des hépatocytes de rats.....	49
6.3 Méthode d'isolation des hépatocytes.....	50
6.4 Avantages des cultures primaires.....	50
6.5 Film de collagène.....	52
CHAPITRE VII	
MÉTHODES D'ÉTUDE DES MÉDICAMENTS SUR LES CULTURES PRIMAIRES	
D'HÉPATOCYTES.....	53
7.1 Viabilité: libération de la lactate déshydrogénase.....	53
7.2 Fonction hépatospécifique: sécrétion d'albumine.....	53
7.3 Métabolisme hépatique: mesure de l'activité des isoformes du CYP450.....	54
7.4 Évaluation de l'apoptose et de la nécrose.....	54
7.4.1 Test de Hoechst.....	55
7.4.2 Iodure de propidium.....	55
7.4.3 Mesure de l'activité des caspases.....	55
7.5 Mesure du potentiel membranaire mitochondrial.....	56
7.6 Évaluation de l'expression protéique.....	56

CHAPITRE VIII	
PRÉSENTATION DU PROJET	57
8.1 Problématique et objectifs de la recherche.....	57
DEUXIÈME PARTIE : PARTIE EXPÉRIMENTALE	61
PRÉFACE	61
CHAPITRE IX	
ARTICLES	62
9.1 Mécanisme de toxicité du bloqueur de canaux calciques Posicor ^{MD} en culture primaire d'hépatocytes.....	62
9.2 Mechanism of toxicity of the calcium channel blocker Posicor ^{MD} in primary cultures of rat hepatocytes.....	63
9.2.1 Abstract.....	64
9.2.2 Introduction.....	65
9.2.3 Materials and Methods.....	69
9.2.4 Results.....	76
9.2.5 Discussion.....	80
9.2.6 Acknowledgements.....	85
9.2.7 References.....	86
9.2.8 Figure legends.....	92
9.2.9 Figures.....	96
9.3 Induction de toxicité par le fongicide Mintezol ^{MD} en culture primaire d'hépatocytes.....	110
9.4 Induction of toxicity by the fungicide Mintezol ^{MD} in primary cultures of rat hepatocytes.....	111
9.4.1 Abstract.....	112
9.4.2 Introduction.....	113
9.4.3 Materials and Methods.....	116
9.4.4 Results.....	123
9.4.5 Discussion.....	126

	viii
9.4.6 Aknowldegements.....	129
9.4.7 References.....	130
9.4.8 Figure legends.....	134
9.4.9 Figures.....	138
CHAPITRE X	
DISCUSSION ET CONCLUSIONS	148
BIBLIOGRAPHIE	158

LISTE DES FIGURES

Figure	page
1.1 Aspect tridimensionnel du lobule hépatique.....	2
1.2 Représentation schématique de l'organisation de l'apport sanguin hépatique.....	4
1.3 Ultrastructure du parenchyme hépatique.....	7
2.1 Les 5 phases de la biotransformation des xénobiotiques par les hépatocytes.....	11
2.2 Cycle réactionnel du cytochrome P450.....	15
3.1 L'apoptose versus la nécrose.....	23
3.2 Classification des caspases.....	25
3.3. Activation des caspases.....	26
3.4 Les deux principales voies d'activation des caspases chez les mammifères.....	29
5.1 Formule structurale de l'acétaminophène.....	36
5.2 Métabolisme de l'APAP.....	38
5.3 Mécanisme d'hépatotoxicité de l'APAP.....	40
5.4 Formule structurale du thiabendazole.....	41
5.5 Mécanisme d'hépatotoxicité du thiabendazole.....	44

5.6 Formule structurale du dichlorhydrate de mibéfradil (Ro-40-5967).....	45
9.1 Decreased viability of rat hepatocytes exposed to mibefradil or APAP.....	96
9.2 Effects of mibefradil or APAP on rat hepatocyte morphology.....	97
9.3 Mibefradil and APAP inhibit albumin secretion in rat hepatocytes.....	99
9.4 Effects of mibefradil and APAP on CYP1A and CYP2B activities in rat hepatocytes.....	100
9.5 Morphological analysis of apoptosis and necrosis in rat hepatocytes following exposure to mibefradil or APAP.....	101
9.6 Translation of FADD from cytosol to membranes induced by mibefradil and APAP in rat hepatocytes.....	103
9.7 Activation of initiator caspase-8 by mibefradil and APAP in rat hepatocytes.....	105
9.8 Induction of depolarization and liberation of cytochrome c by mibefradil and APAP in rat hepatocytes.....	106
9.9 Activation of initiator caspase-9 by mibefradil and APAP in rat hepatocytes.....	108
9.10 Activation of executor caspase-3 by mibefradil and APAP in rat hepatocytes.....	109
9.11 Decreased viability of rat hepatocytes exposed to increasing concentrations of thiabendazole	138
9.12 Effects of thiabendazole on rat hepatocyte morphology.....	139
9.13 Thiabendazole has a minor effect on albumin secretion in rat hepatocytes	140

9.14 Effect of increasing concentrations of thiabendazole on CYP1A and CYP2B activities in rat hepatocytes.....	141
9.15 Morphological analysis of apoptosis and necrosis in rat hepatocytes following exposure to thiabendazole	142
9.16 Translocation of FADD from the cytosol to membranes induced by in rat hepatocytes.....	143
9.17 Activation of initiator caspase-8 by thiabendazole in rat hepatocytes.....	144
9.18 Induction of depolarization and liberation of cytochrome c by thiabendazole in rat hepatocytes.....	145
9.19 Activation of initiator caspase-9 by thiabendazole in rat hepatocytes.....	146
9.20 Activation of executor caspase-3 by thiabendazole in rat hepatocytes.....	147

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	page
2.1 Principales enzymes impliquées dans le métabolisme de phase I des médicaments.....	13
2.2 Liste partielle des isoenzymes du CYP450 retrouvées chez le rat.....	16
2.3 Liste partielle des inducteurs connus de certaines isoformes du CYP450 chez le rat.....	17
2.4 Liste d'inhibiteurs généraux des isoformes du CYP450 chez le rat.....	18
4.1 Hépatotoxicité intrinsèque et idiosyncrasie.....	31
4.2 Principales hépatopathies médicamenteuses.....	32
5.1 Liste partielle des médicaments interagissant avec le Posicor ^{MD}	46

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-OH-APAP	3-hydroxyacétanilide
3-OH-Tbz	3-hydroxythiabendazole
4-OH-Tbz	4-hydroxythiabendazole
5-OH-Tbz	5-hydroxythiabendazole
AAP	N-acétyl-para-aminophénol
ABC	«ATP-binding cassette»
Acétyl-Co A	Acétyl coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Facteur inducteur de l'apoptose
AAT	Alanine aminotransférase
Apaf-1	«Apoptosis protease-activating factor-1»
APAP	N-acétyl-para-aminophénol
ARN	Acide ribonucléique
AST	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl-2	«B-cell lymphoma-2»
BH	«Bcl-2 homology region»
Ca ²⁺	Calcium ionique
Ca ²⁺ -ATPase	Calcium ATPase
CAD	«Caspase Activated DNase»
Caspases	«Cysteine aspartyl proteases»
Cellules NK	Cellules tueuses naturelles
c-FLICE	«c-Fas-associated death domain-like IL-1 beta-converting enzyme»
c-FLIP	«c-FLICE inhibitory protein»
COX	Cyclo-oxygénase
CRD	Domaine riche en cystéine
CYP	Cytochrome
CYP450	Cytochrome P450
Cyto c	Cytochrome c
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
DD	Domaine de mort
DED	Domaine effecteur de mort
DISC	«Death-inducing signaling complex»
DR	«Death receptor»
ELISA	«Enzyme-Linked ImmunoSorbent assay»
EMTX	Enzymes du métabolisme et du transport des xénobiotiques
EROD	7-éthoxyrésorufin-O-dééthylase
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FADD	«Fas-associated death domain»
FasL	Ligand Fas
Fe ²⁺	Ion ferreux
Fe ³⁺	Ion ferrique

FMN	Flavine mononucléotide
FMO	Monooxygénase à flavine
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-transférase
H33258	Hoechst 33258
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
IAP	«Inhibitor of apoptosis protein»
ICAD	Inhibiteur de la «Caspase Activated DNase»
IHA	Insuffisance hépatique aiguë
INN	«International Nonproprietary Name»
JNK	«Jun N-terminal kinase»
LDH	Lactate deshydrogénase
LPO	Peroxydation des lipides
MDMA	3,4 methylenedioxymethamphetamine
MRP	«Multidrug resistance-associated protein»
NAC	N-acétylcystéine
NAD ⁺	Forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAPQI	N-acétyl-para-benzoquinone-imine
NFκB	Facteur nucléaire de transcription kappa B
NO	Oxyde nitrique
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OAT	«Organic anion transporter»
OATP	«Organic anion transporting polypeptide»
OCT	«Organic cation transporter»
O-Gluc	«O-glucuronidated»
OH	Hydroxylated
SLC	«Solute carrier»
ONOO ⁻	Peroxynitrite
OPND	o-phénylènediamine
PARP	Poly(ADP-ribose)polymérase
P-gp	P-glycoprotéine
PI	Iodure de propidium
PROD	7-pentoxyrésorufin-O-déalkylase
RH-123	Rhodamine 123
Smac/Diablo	«Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP binding protein with low pI»
Tbz	Thiabendazole
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TNF-R1	«Tumor Necrosis Factor Receptor-1»
TPM	Transition de perméabilité membranaire
TRADD	«TNF-R-associated death domain»
TRAF-2	«TNFR-associated factor-2»
TUNEL	«Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling»
USAN	«United States Adopted Name»

RÉSUMÉ

Plusieurs médicaments utilisés chez l'humain peuvent exercer des effets hépatotoxiques que l'on peut évaluer en système de culture primaire d'hépatocytes. On attribue aux hépatocytes des fonctions physiologiques essentielles. Ainsi, entre autres, ils sont impliqués dans le métabolisme des lipides, des glucides et des protéines. De plus, les hépatocytes constituent le principal site du métabolisme des médicaments, et c'est spécifiquement à leur niveau que se manifeste l'hépatotoxicité médicamenteuse. Celle-ci peut mener à de graves maladies hépatiques parmi lesquelles l'insuffisance hépatique aiguë, qui s'avère associée à une incidence de mortalité de 45 à 95% selon l'étiologie.

Nous avons donc entrepris l'étude, en culture primaire d'hépatocytes de rat sur film de collagène, du Mintezol^{MD} (thiabendazole) et du Posicor^{MD} (mibéfradil), deux médicaments dont les mécanismes d'hépatotoxicité ne sont pas bien connus. Le thiabendazole est un antihelminthique et fongicide, alors que le mibéfradil était autrefois employé pour le traitement de l'hypertension et de l'angine de poitrine. De plus, l'analgésique et antipyrétique Tyléno^{MD} (acétaminophène ou APAP), dont les mécanismes d'hépatotoxicité sont connus, a servi de composé de référence. Nous avons évalué, pour chaque médicament, l'hépatotoxicité et le métabolisme de même que le type et le mécanisme de mort cellulaire induit.

Les résultats obtenus montrent que c'est le mibéfradil (5-20 μ M, 24 et 48 h) qui mène aux changements morphologiques les plus importants et affecte le plus la viabilité et le niveau de synthèse d'albumine des hépatocytes. Nous avons de plus observé une augmentation de la mort cellulaire par nécrose avec la concentration et le temps (24 h, 48 h) pour le mibéfradil (5-20 μ M) et l'APAP (10-40 mM). Toutefois, avec le thiabendazole (100-500 μ M, 24 h et 48 h), peu de cytotoxicité ou d'effets sur la fonction métabolique des hépatocytes ont été détectés. Aussi, l'activité du 7-éthoxyresorufin-o-deéthylase (EROD), un substrat du CYP1A1, a été induite par le thiabendazole (100-500 μ M) et l'APAP (10-40 mM), après 24 h et 48 h, alors que le mibéfradil (5-20 μ M, 24 h et 48 h) n'a exercé aucun effet. Toutefois, l'activité du 7-pentoxyresorufin-o-dealkylase (PROD), un substrat du CYP2B, a été induite par les 3 médicaments, dans les mêmes conditions que pour la mesure de EROD. Nous avons par ailleurs mesuré une induction globale de la mort cellulaire par apoptose, détectée par la condensation de la chromatine, avec les médicaments. Cette induction s'est manifestée par une activation des caspases-3, -8 et -9 par le thiabendazole (200 μ M) et l'APAP (5 mM) après 1 h d'exposition, et par le mibéfradil (5 μ M) après 3 h (caspase-2) et 12 h (caspases-3 et -8). Aux mêmes concentrations, ces médicaments ont de plus induit une baisse du potentiel membranaire mitochondrial et une libération de cytochrome c dans le cytosol (1 h thiabendazole et APAP; 3 h mibéfradil), et la translocation de la protéine «Fas-associated death domain» (FADD) du cytosol aux membranes (1 h thiabendazole et APAP; 12 h mibéfradil).

Ainsi, d'une part, le mibéfradil serait plus hépatotoxique que l'APAP et le thiabendazole. D'autre part, l'étude de la signalisation apoptotique suggère que les médicaments étudiés activent tous la voie mitochondriale de l'apoptose de même que celle des récepteurs de mort. Cette étude contribue à l'avancement des connaissances sur l'hépatotoxicité du mibéfradil et du thiabendazole, en apportant une meilleure compréhension de l'hépatotoxicité de ces médicaments. Ceci permettra d'explorer des moyens de diminuer la toxicité du thiabendazole, et de diriger la recherche sur le développement de médicaments similaires au mibéfradil démontrant moins d'hépatotoxicité.

Mots clés : mibéfradil; thiabendazole; acétaminophène; apoptose; nécrose; hépatocytes, hépatotoxicité; caspases; albumine.

CHAPITRE I

LE FOIE

1.1 Généralités

Le foie représente l'organe interne le plus volumineux du corps humain et pèse en moyenne 1.5 kg chez l'adulte (2 à 5% du poids corporel). Chez le rat, il se caractérise par un poids moyen de 16 g, soit 4% de la masse corporelle totale. D'aspect rouge-brunâtre et de forme ovoïde, le foie se situe du côté supérieur droit de la cavité abdominale, entre le diaphragme et l'estomac, et s'avère responsable de plusieurs fonctions physiologiques vitales (Meeks et al., 1991; Thomson et Shaffer, 2005).

1.2 Histologie du foie

1.2.1 Organisation structurelle

L'organisation structurelle du foie témoigne de sa fonction primordiale qui est de servir de gardien de l'homéostasie corporelle. Le foie est localisé entre le tractus digestif et le reste de l'organisme. À cause de cette situation privilégiée, il reçoit et gère la plupart des nutriments et des substances nocives provenant du métabolisme cellulaire et de la circulation (Meeks et al., 1991). Chez l'humain, le foie est formé de deux lobes principaux, le droit et le gauche, ainsi que de deux petits lobes, à savoir, le lobe caudé à la face postérieure, et le lobe carré à la face inférieure. Toutefois, chez de nombreux animaux, par exemple le rat, le foie présente une lobation plus accentuée (Thomson et Shaffer, 2000). Ces lobes sont enveloppés d'une membrane fibreuse constituée de tissu conjonctif dense, la capsule de Glisson, et chaque lobe se subdivise lui-même en un grand nombre d'unités fonctionnelles appelées lobules (Thomson et Shaffer, 2000; Figure 1.1). De forme hexagonale, le lobule hépatique est centré par une veinule hépatique terminale centrale ou veine centrolobulaire, et limité par 4 ou 5 espaces portes (espaces de Kiernan) formés de tissu conjonctif fibreux et irrigués par la veine porte et l'artère hépatique (Meeks et al., 1991). Il comprend par ailleurs trois éléments :

les travées cellulaires ou travées de Remak, les capillaires sinusoides ou radiés, et les canalicules biliaires qui aboutissent au canal biliaire de l'espace porte (Meeks et al., 1991; Figure 1.1). De plus, une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte et un canal biliaire forment ensemble une triade portale (Meeks et al., 1991; Figure 1.1).

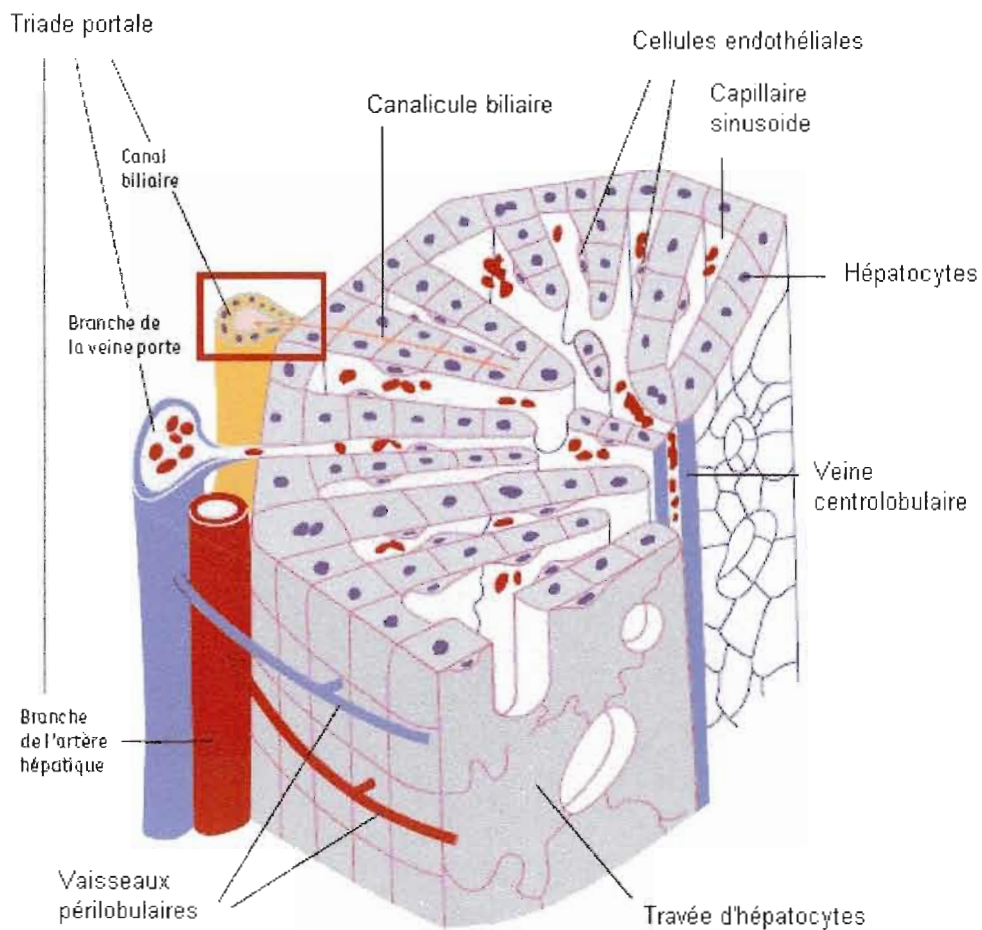


Figure 1.1 : Aspect tridimensionnel du lobule hépatique. Le lobule hépatique est de forme hexagonale et centré par une veine centrolobulaire. Il est constitué de travées d'hépatocytes (travées de Remak) au contact de capillaires sinusoides, et de canalicules biliaires (en orange). Par ailleurs, un canal biliaire, ainsi qu'une branche de la veine porte et une branche de l'artère hépatique (qui se prolongent en vaisseaux périlobulaires) forment ensemble une triade portale (Adapté de Laperche, 2003).

Le lobule hépatique correspond à l'unité structurelle du foie, c'est-à-dire aux travées dont les sinusoides se drainent dans la veine centrolobulaire. Toutefois, deux autres concepts, davantage adaptés à la physiologie et à la pathologie, ont été développés pour définir la subdivision de cet organe (Meeks et al., 1991). En particulier, l'acinus de Rappaport, qui est de forme losangique, est cloisonné par les veines centrolobulaires de deux lobules contigus et par les angles de jonction de ces derniers, dont l'un s'avère portal et l'autre non portal; il constitue l'unité artérielle car centrée sur une branche de l'artère hépatique (Rappaport, 1987). L'acinus se divise en trois zones définies selon la distance les séparant des vaisseaux nourriciers, donc selon le degré d'oxygénation. La zone la mieux oxygénée est appelée zone périportale (zone 1), alors que la moins oxygénée correspond à la zone centrolobulaire (zone 3). La région de transition entre les zones 1 et 3 se nomme zone médiolobulaire ou intermédiaire (Meeks et al., 1991).

1.2.2 Apport sanguin

Fortement vascularisé, le foie bénéficie d'un apport sanguin double : veineux et artériel (Meeks et al., 1991; Figure 1.2). L'apport en sang est assuré par deux larges vaisseaux : l'artère hépatique et la veine porte. Chez l'humain, alors que cette dernière véhicule 75% du sang afférant, l'artère hépatique transporte les 25% restant (Thomson et Shaffer, 2005; Figure 1.2). La veine porte achemine vers le foie le sang veineux désoxygéné ayant circulé à travers le tube digestif et la rate. Alors que le sang du tractus digestif contient les métabolites de la digestion, celui provenant de la rate s'avère riche en métabolites de l'hémoglobine. Quant à l'artère hépatique, elle fournit le sang oxygéné et provient de l'aorte (Meeks et al., 1991; Figure 1.2).

Le sang afférent part de la périphérie du lobule hépatique vers la veine centrolobulaire en passant à travers les sinusoides (Meeks et al., 1991; Thomson et Shaffer, 2005; Figure 1.2). La vascularisation efférente est représentée par la confluence des veines centrales en veines sus-hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure, laquelle reçoit ainsi les éléments utilisables ou éliminables par la sécrétion exocrine hépatique (Meeks et al., 1991; Thomson et Shaffer, 2005; Figure 1.2). Un vaste réseau de vaisseaux lymphatiques draine également le foie (Thomson et Shaffer, 2000).

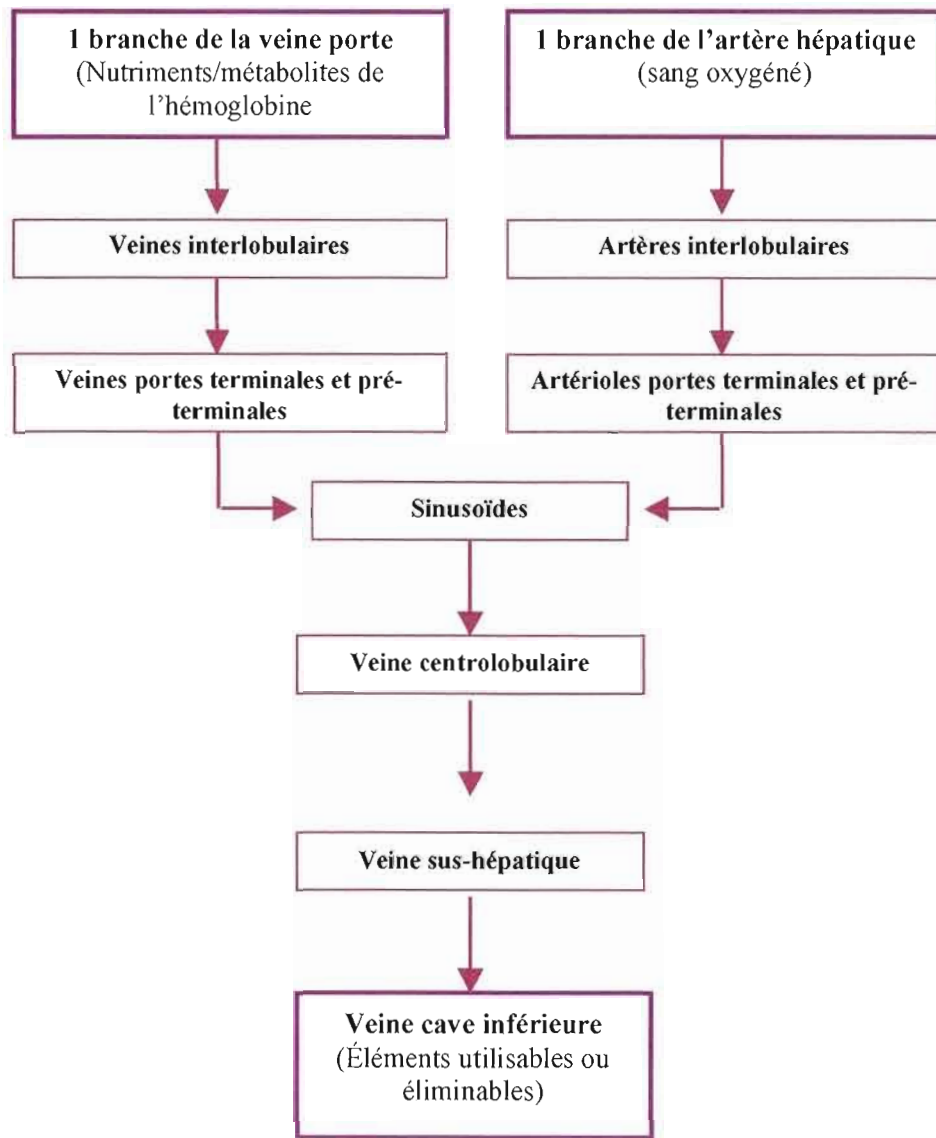


Figure 1.2 : Représentation schématique de l'organisation de l'apport sanguin hépatique. (Adapté de Meeks et al., 1991).

1.2.3 Cellules composant le foie

1.2.3.1 Cellules parenchymateuses : les hépatocytes.

Les cellules parenchymateuses, ou hépatocytes, sont les plus nombreuses du foie; elles constituent chez le rat 60% de l'ensemble des cellules de l'organe et environ 80% du volume hépatique (Blouin et al., 1977; Meeks et al., 1991). Il s'agit de cellules épithéliales polygonales de grande taille, organisées en travées anastomosées irrégulières et unicellulaires rayonnant autour d'une veine centrale. Également, elles sont associées les unes aux autres par des jonctions lacunaires et séparées par les capillaires sinusoides (Meeks et al., 1991).

Par ailleurs, les hépatocytes possèdent un noyau central, rond et volumineux, et certains sont binucléés, voire polynucléés (Meeks et al., 1991). Également, leur cytoplasme est de type éosinophile granuleux puisque très riche en mitochondries et organites intracellulaires (ex.: appareil de Golgi et les réticulum endoplasmiques lisse et rugueux). Cette abondance en organites cytoplasmiques reflète une importante activité métabolique, ce qui explique d'ailleurs que ce type cellulaire en particulier ait été choisi comme modèle pour notre étude: les hépatocytes représentent le centre fonctionnel du foie (Meeks et al., 1991; Berry et Edwards, 2000).

1.2.3.2 Les cellules non parenchymateuses

Bien que le foie s'avère composé majoritairement de cellules parenchymateuses, la paroi des capillaires sinusoides comprend 4 autres types cellulaires : les cellules endothéliales, les cellules de Küpffer, les cellules de Ito et les cellules de Pit (Meeks et al., 1991; Kmiec, 2001; Figure 1.3). Ensemble, ces cellules non parenchymateuses représentent environ 40 % de la totalité des cellules du foie mais n'occupent que 6.3 % du volume hépatique total (Meeks et al., 1991; Kmiec, 2001; Thomson et Shaffer, 2005).

1.2.3.2.1 Les cellules endothéliales des capillaires sinusoides

Les cellules endothéliales des capillaires sinusoides (Figure 1.3) diffèrent de celles des autres endothéliums vasculaires de l'organisme car elles ne possèdent pas de membrane basale et sont fenêtrées; cette porosité permet aux hépatocytes d'accéder facilement aux nutriments et macromolécules plasmatiques (Meeks et al., 1991; Thomson et Shaffer, 2000). De plus, ces cellules jouent un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines et s'avèrent impliquées dans l'endocytose de molécules et de particules (Meeks et al., 1991; Thomson et Shaffer, 2005).

1.2.3.2.2 Les cellules de Küpffer

Situées à la surface luminale des cellules endothéliales, les cellules de Küpffer (Figure 1.3) sont des macrophages tissulaires qui, principalement, phagocytent les particules étrangères et les hématies usées ou anormales et éliminent certaines bactéries, les endotoxines et d'autres substances nocives (Meeks et al., 1991; Thomson et Shaffer, 2005).

1.2.3.2.3 Les cellules de Ito

De forme étoilée, les cellules de Ito (Figure 1.3) sont périsinusoïdales puisque localisées dans l'espace de Disse, qui sépare les sinusoides des hépatocytes. Riches en graisses, elles jouent un rôle dans le métabolisme et l'emménagement de la vitamine A et la synthèse de molécules de la matrice extracellulaire (ex. : collagène).

1.2.3.2.4 Les cellules de Pit

Situées dans la lumière des capillaires, les cellules de Pit sont les moins nombreuses de la paroi sinusoidale. Il s'agit de lymphocytes volumineux et granuleux agissant comme des cellules tueuses naturelles à activités antivirales et antitumorales (Meeks et al., 1991; Thomson et Shaffer, 2005).

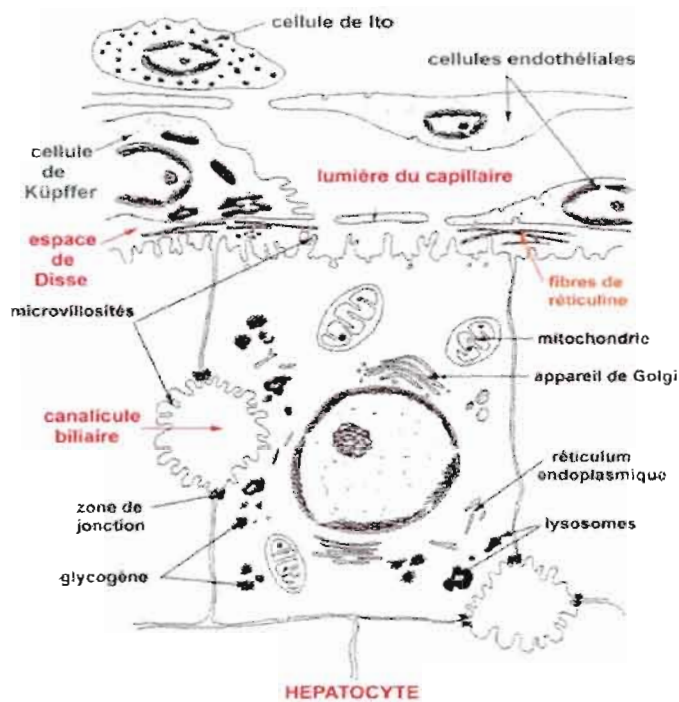


Figure 1.3 : Ultrastructure du parenchyme hépatique. La paroi des capillaires sinusoides contient 4 types de cellules non parenchymateuses, soit les cellules endothéliales, celles de Kupffer, de Pit (non représentées sur ce schéma) et de Ito. (Vacheret, 1999)

1.3 Fonctions hépatiques

Le foie exerce plusieurs fonctions physiologiques (métaboliques, immunitaires, digestive et de biotransformation) essentielles au bon fonctionnement de l'organisme, et un dysfonctionnement de cet organe peut mener à la mortalité. La plupart s'avèrent prises en charge par les hépatocytes, mis à part les fonctions immunitaires, qui sont attribuées aux cellules de Pit et de Kupffer (Meeks et al., 1991).

1.3.1 Fonction biliaires des hépatocytes

Le foie est une glande digestive exocrine (Jones et Spring-Mills, 1984). Les hépatocytes élaborent et sécrètent la bile, liquide jaunâtre et légèrement alcalin composé essentiellement d'eau, d'ions, d'acides et de sels biliaires, de cholestérol et de la bilirubine (pigment provenant surtout de la dégradation des hématies) (Jones et Spring-Mills, 1984 ;

Jacquemin, 1998). Sécrétée de façon continue, la bile est emmagasinée et concentrée dans la vésicule biliaire en période de jeûne (Jones et Spring-Mills, 1984). En réponse à un stimulus hormonal (libération de la cholécystokinine du petit intestin), elle se trouve évacuée de la vésicule biliaire puis acheminée vers le duodénum (Jones and Spring-Mills, 1984). Là, les acides et les sels biliaires participent à l'émulsification des lipides alimentaires et des vitamines liposolubles, facilitant ainsi leur digestion par les lipases pancréatiques et leur absorption (Meeks et al., 1991; Jacquemin, 1998).

1.3.2 Fonctions métaboliques des hépatocytes

1.3.2.1 Métabolisme glucidique

Les hépatocytes jouent un rôle important dans le métabolisme des glucides en assurant le maintien d'une glycémie normale. Pour cela, lorsque la concentration sanguine en glucose atteint un niveau trop élevé, celui-ci est converti en glycogène (glycogénèse) et emmagasiné dans les hépatocytes; quand, au contraire, cette concentration devient trop faible, les cellules hépatocytaires dégradent en glucose les réserves intrahépatiques de glycogène (glycogénolyse) (Thomson et Shaffer, 2000). Également, les hépatocytes peuvent synthétiser le glycogène à partir des lipides ou des protides (néoglycogénèse), et convertir en glucose différentes substances non glucidiques telles que des acides aminés (gluconéogenèse) (Thomson et Shaffer, 2000).

1.3.2.2 Métabolisme lipidique

Les hépatocytes se montrent très actifs dans le métabolisme des lipides. Ils captent ainsi les acides gras et les estérifient en triglycérides qu'ils emmagasinent, et synthétisent du cholestérol, des phospholipides et des lipoprotéines plasmatiques (Thomson et Shaffer, 2005). Ces dernières s'avèrent composées des lipides ainsi que d'apolipoprotéines (Corvilain et al., 1997; Thomson et Shaffer, 2005). Les hépatocytes servent, de plus, de lieu d'emmagasinage des vitamines et d'oligo-éléments (ex. : fer, cuivre), et sont impliqués dans le métabolisme de certaines hormones (Marieb, 1999).

1.3.2.3 Métabolisme protéique

À partir des acides aminés puisés dans les capillaires, les hépatocytes synthétisent de façon continue la plupart des protéines du plasma sanguin, y compris l'albumine et la majorité des globulines autres que les gammaglobulines (Thomson et Shaffer, 2005). L'albumine est une protéine sérique synthétisée exclusivement par les hépatocytes, et il s'agit de la plus abondante du système sanguin (Carter et Ho, 1994; Thomson et Shaffer, 2000). Quant aux globulines, elles comprennent des facteurs de coagulation dépendants (prothrombine ou facteur II, facteurs VII, IX et X) ou indépendants (facteur V) de la vitamine K. Le foie s'avère de plus le siège du catabolisme des acides aminés en urée. Durant ce processus, appelé cycle de l'urée, l'ammoniaque, produit du métabolisme de l'azote et possible neurotoxine, est utilisé et par conséquent détoxiqué (Thomson et Shaffer, 2005).

1.3.3 Fonction de biotransformation des hépatocytes

Les hépatocytes s'avèrent responsables de la biotransformation des composés potentiellement toxiques en composés non toxiques, excrétés dans les sécrétions biliaires et l'urine. C'est en fait principalement le système enzymatique monooxygénase du cytochrome P450 qui permet la conversion des xénobiotiques, c'est-à-dire, de toutes les substances naturelles ou artificielles de faible poids moléculaire étrangères à l'organisme (médicaments, produits de l'alimentation, substances polluantes de l'environnement) et souvent hydrophobes, en composés hydrosolubles facilement éliminés (Jones et Spring-Mills, 1984 ; Meeks et al., 1991). Le métabolisme des xénobiotiques sera expliqué de façon plus détaillée dans le chapitre qui suit.

CHAPITRE II

MÉTABOLISME DES XÉNOBIOTIQUES

2.1 Généralités

Le foie constitue le principal site de la biotransformation des xénobiotiques pénétrant intentionnellement (médicaments, produits de l'alimentation) ou non intentionnellement (ex. : polluants environnementaux) dans l'organisme, et ce processus se déroule spécifiquement dans les hépatocytes (Meeks et al., 1991; Berry et Edwards, 2000). Certains xénobiotiques peuvent traverser la bicouche lipidique des cellules, et leur biotransformation a pour principale conséquence la formation de métabolites qui sont ensuite retirés du corps (Meeks et al., 1991; Jacquemin, 1998; Berry et Edwards, 2000). Étant donné la variabilité importante de la nature chimique des xénobiotiques, de nombreuses enzymes et isoenzymes se montrent nécessaires pour leur métabolisme; il s'agit des enzymes du métabolisme et du transport des xénobiotiques (EMTX), réparties en différentes phases (Meeks et al., 1991; Ortiz de Montellano, 1995).

Habituellement, il y a premièrement transport du xénobiotique du sang vers l'intérieur de la cellule «(métabolisme de phase 0) (Figure 2.1), puis la substance est tout d'abord oxydée, mais aussi parfois réduite ou hydrolysée, principalement par le système enzymatique monooxygénase du cytochrome P450 (métabolisme de phase 1) (Figure 2.1); elle est ensuite conjuguée à des molécules hautement polaires telles que le glutathion, la cystéine et le sulfate (métabolisme de phase 2) (Figure 2.1). Les métabolites, devenus hydrosolubles, sont ensuite transportés à l'aide de protéines de transport directement vers les canalicules biliaires puis excrétés dans la bile, ou sont à nouveau libérés dans le système sanguin et excrétés dans l'urine via les reins (métabolisme de phase 4) (Figure 2.1). De plus, le métabolisme de phase 3 correspond au transport intracellulaire des xénobiotiques (Jacquemin, 1998; Berry et Edwards, 2000; Petzinger et Geyer, 2006; Figure 2.1)

Enfin, bien que le système de biotransformation se retrouve également dans d'autres

sites (poumons, reins, intestins, flore intestinale, peau et organes endocrines), quantitativement, celui du foie demeure plus important (Meeks et al., 1991).

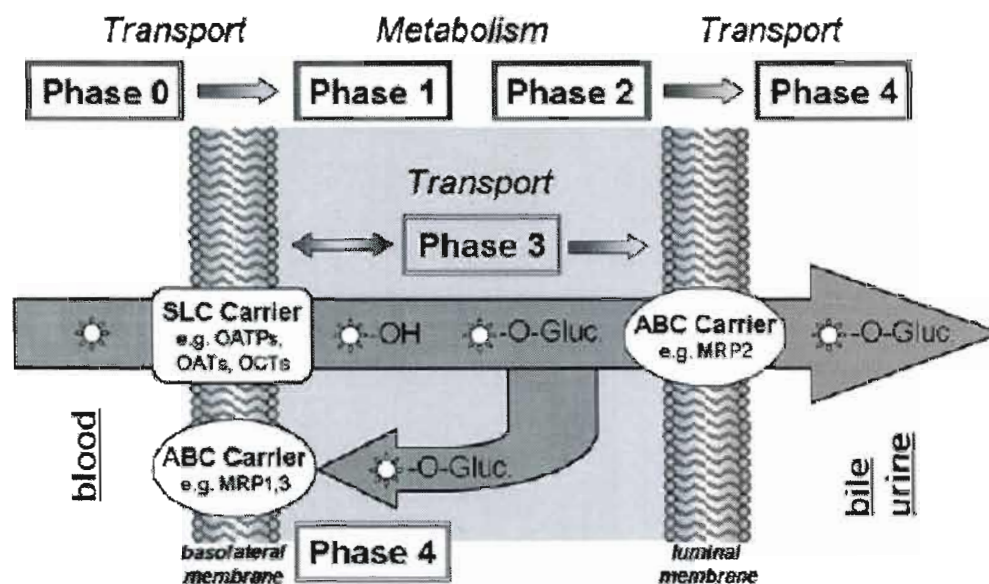


Figure 2.1 : Les 5 phases de la biotransformation des xénobiotiques par les hépatocytes. Les xénobiotiques subissent normalement un métabolisme en 5 phases : le transport, du sang vers l'intérieur de la cellule, par des protéines de transport SLC (ex. : OATPs; OATs; OCTs) (phase 0), la fonctionnalisation (phase 1), la conjugaison (phase 2), le transport intracellulaire (phase 3), et le transport de l'intérieur à l'extérieur de la cellule vers le sang ou vers les canalicules biliaires, via des protéines de transport ABC (ex. : MRP1, 2, 3) (phase 4).

ABC : «ATP-binding cassette»; MRP: «multidrug resistance-associated proteins»; OATs: «Organic anion transporters»; OATPs: «Organic anion transporting polypeptides»; OCTs: «Organic cation transporters»; O-Gluc: O-glucorinidated; OH: hydroxylated; SLC: «Solute carrier» (Petzinger et Geyer, 2006).

2.2 Les 5 phases du métabolisme des xénobiotiques

2.2.1 Métabolisme de phase 0

La première phase du métabolisme des xénobiotiques, nommée phase 0, est médiée par les transporteurs «Solute carrier» (SLC), qui comprennent les «Organic anion

transporters» (OATs), les «Organic anion transporting polypeptides» (OATPs), et les «Organic cation transporters» (OCTs). Il s'agit de l'étape initiale de l'élimination des xénobiotiques du sang aux hépatocytes, via le transport à travers la membrane basolatérale, ou de la première étape de l'absorption des xénobiotiques de l'intestin, c'est-à-dire, le transport à travers la membrane luminale vers les entérocytes (Petzinger et Geyer, 2006).

2.2.2 Métabolisme de phase 1

2.2.2.1 Généralités

Le métabolisme de phase 1 a pour but la biotransformation des xénobiotiques en métabolites dotés d'une fonction réactive qui leur permettra de réagir avec un groupement polaire et de devenir ainsi plus hydrosolubles (Blake et al., 1995). Ce métabolisme met en jeu la réduction, l'hydrolyse mais surtout l'oxydation des composés exogènes par des enzymes dites de fonctionnalisation (Meeks et al., 1991; Tableau 2.1). Parmi celles-ci, les isoenzymes du système enzymatique monooxygénase du cytochrome P450 prennent en charge 90% des réactions d'oxydation, les 10% restants pouvant être attribués principalement aux flavines mono-oxygénases (FMOs), puis aux molybdenum hydroxylases (Ziegler, 1988; Meeks et al., 1991; Blake et al., 1995; Tableau 2.1).

Il existe plusieurs autres enzymes impliquées dans le métabolisme de phase 1. Il s'agit entre autres des estérases et des amidases, qui hydrolysent les liens esters et amides de façon non spécifique, mais aussi d'enzymes impliquées spécifiquement dans la biotransformation des alcools (alcools déshydrogénases), des aldéhydes (aldéhydes déshydrogénases, aldéhydes réductases) et des cétones (cétones réductases) (Meeks et al., 1991; Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Principales enzymes impliquées dans le métabolisme de phase I des médicaments (Adapté de Guengerich, 1996; Jae et al., 2003).

Oxygénases et oxydases
Cytochromes P450
Flavine mono-oxygénases (FMO)
Molybdenum hydroxylases
(Aldéhyde oxydases et xanthine oxydases/déshydrogénases)
Peroxydases
Monoamines oxydases
Alcools déshydrogénases
Aldéhydes déshydrogénases
Aldéhydes réductases
Cétones réductases
Quinones réductases
Autres enzymes
Estérases (ex. : Amidases)
Époxydes hydrolases
Dipeptidases
γ -Glutamyl-transpeptidases
Cystéine conjuguée β -lyases

2.2.2.2 Le système enzymatique monooxygénase du cytochrome P450

2.2.2.2.1 Généralités

Les cytochromes P450s (ou CYP450) sont des hémoprotéines membranaires présentes chez les eucaryotes et les procaryotes. Chez les mammifères, ils sont localisés principalement dans le réticulum endoplasmique et exprimés de façon largement prédominante dans le foie. (Meeks et al., 1991; Pessayre, 1993).

Outre leur rôle dans la biotransformation des xénobiotiques, les CYP450 s'avèrent impliqués dans la synthèse et/ou du catabolisme de composés endogènes critiques pour la fonction cellulaire (ex. : stéroïdes et des acides gras) (Gonzalez, 1988; Ryan et Levin, 1990; Meeks et al., 1991). Enfin, l'expression et l'activité des CYP450s dans les différents tissus de l'organisme se caractérisent par une importante diversité intra et interespèces (Murray, 1992; Beaune, 1993; Guengerich, 2006).

2.2.2.2.2 Réaction catalysée par le CYP450

Le CYP450 est un cytochrome de type b dont la molécule d'hème se trouve attachée à l'apoprotéine par une liaison de coordination établie entre le fer de l'hème et un résidu cystéine de l'apoprotéine. Le fer se présente sous forme d'ion ferreux (Fe^{2+}) lorsque réduit, et d'ion ferrique (Fe^{3+}) lorsque oxydé (Meeks et al., 1991). La liaison du substrat à la forme ferrique de l'enzyme dans la poche hydrophobe de l'apoprotéine mène à la réduction à l'état ferreux suite au transfert d'un électron via la réductase; le Fe^{2+} servira à la fixation de l'oxygène moléculaire (O_2), lequel ira réagir avec le substrat selon un cycle réactionnel complexe dans lequel le NADPH sert de donneur d'électrons (Beaune, 1993; Ortiz de Montellano, 1995; Figure 2.2).

2.2.2.2.3 Isoenzymes du CYP450

Le CYP450 est présent sous forme de plusieurs isoenzymes (Gonzalez, 1988; Ortiz de Montellano, 1995; Tableau 2.2) possédant toutes comme centre actif le fer de l'hème où se fixera l'oxygène moléculaire pour permettre l'oxydation du substrat; ces enzymes se différencient donc uniquement par l'apolipoprotéine (Larrey, 1986).

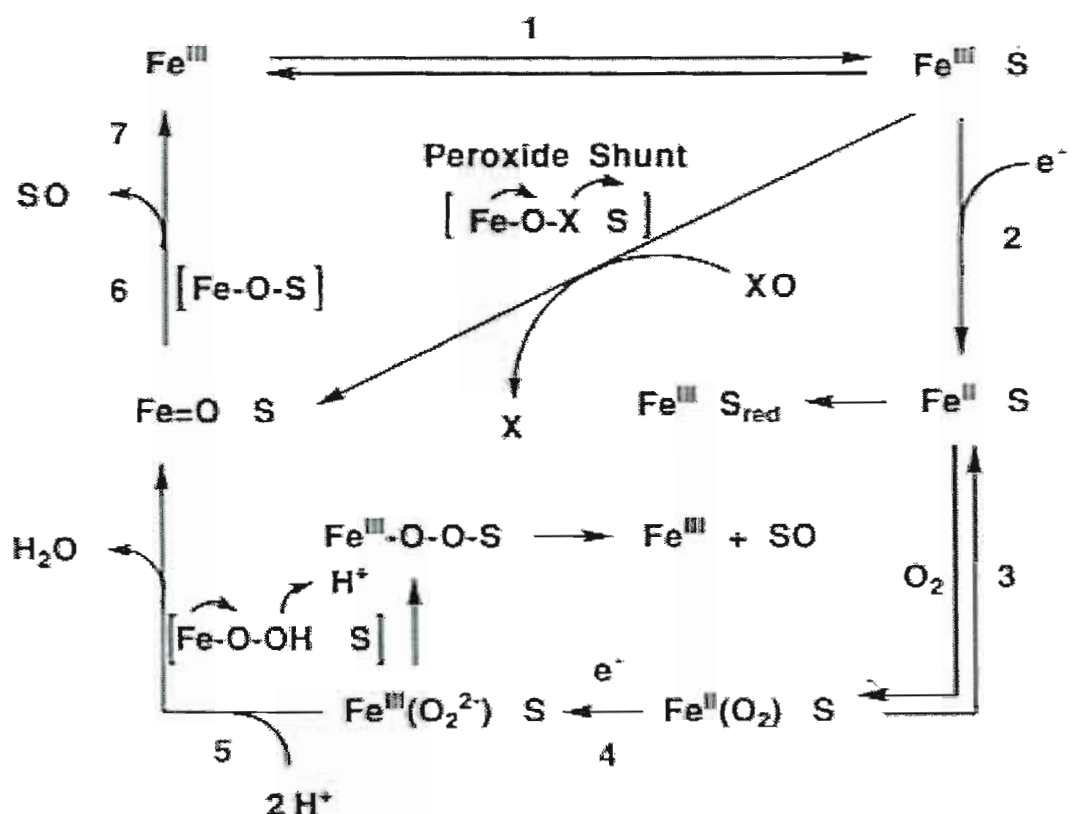


Figure 2.2 : Cycle réactionnel du cytochrome P450. Les principales étapes impliquent : (1) la liaison du substrat (S), (2) la réduction du CYP450 de l'état ferrique à l'état ferreux par transfert d'un électron, (3) la liaison de l'oxygène moléculaire et la formation d'un complexe oxycytochrome P450, (4) le transfert du second électron à ce complexe et la formation d'un intermédiaire peroxyctochrome, (5) la protonation et le clivage du lien $\text{O}-\text{O}$ avec l'incorporation d'un atome d'oxygène distal dans une molécule d'eau et la formation d'espèces ferriques oxydées réactives, (6) le transfert de l'atome d'oxygène de ce complexe oxydatif au substrat lié, puis (7) la dissociation et la libération du produit (Ortiz de Montellano, 1995).

Tableau 2.2 : Liste partielle des isoenzymes du CYP450 retrouvées chez le rat (Ortiz de Montellano, 1995).

Famille/Sous-famille
CYP1A1/2
CYP2A1/2
CYP2B1/2
CYP2C6/7/11/12
CYP2D1/2
CYP2E1
CYP3A1/2
CYP4A1

Cependant, il n'existe pas toujours une correspondance entre les isoformes des différentes espèces; ainsi, entre autres, celles de l'humain et du rat diffèrent souvent par le dernier chiffre, qui représente le gène individuel à l'intérieur de la sous-famille (Berry et Edwards, 2000). Par exemple, l'isoforme CYP3A4, qui s'avère responsable de la plupart des voies métaboliques des médicaments chez l'humain, correspond chez le rat au CYP3A2 (Ortiz de Montellano, 1995; Berry et Edwards, 2000). À cause de ces différences entre les espèces dans le métabolisme des xénobiotiques, l'extrapolation à l'humain des résultats d'études effectuées sur le rat doit être faite avec prudence (Berry et Edwards, 2000).

Par ailleurs, la synthèse *de novo* de plusieurs isoformes du CYP450 peut être induite ou inhibée respectivement par des inducteurs et des inhibiteurs plus ou moins sélectifs (Beaune, 1993).

2.2.2.2.4 Induction des CYP450s

Certaines isoenzymes du CYP450 sont inductibles, ce qui signifie que, suite à l'exposition de la cellule à une substance inductrice (Tableau 2.3), l'activité de l'enzyme

augmente de façon modérée à très importante (Beaune, 1993; Ortiz de Montellano, 1995). Habituellement, l'induction enzymatique favorise la détoxification, en particulier en présence de concentrations faibles à modérées de substrat (Ortiz de Montellano, 1995). Cependant, elle peut se montrer, dans certains cas, désavantageuse. Par exemple, les isoformes induites métabolisent souvent plusieurs substrats et ainsi, il est possible que l'induction par un composé mène au métabolisme accru d'un autre; si celui-ci se caractérise par un faible index thérapeutique, l'augmentation de son métabolisme risque de résulter en une perte de son efficacité (Ortiz de Montellano, 1995). De plus, l'augmentation de l'activité enzymatique peut dans certains cas accroître la toxicité chimique. En particulier, des concentrations importantes d'acétaminophène saturent les voies de détoxification, menant à des réactions via le CYP450 qui génèrent des électrophiles réactifs (Thomas, 1993; Park et al., 2005). Ce phénomène sera expliqué plus en détails au Chapitre 5.

Tableau 2.3 : Liste partielle d'inducteurs connus de certaines isoformes du CYP450 chez le rat (Ortiz de Montellano, 1995).

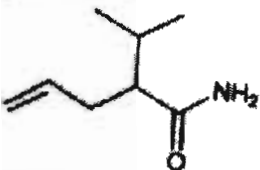
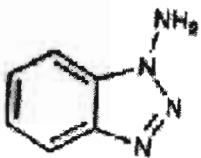
Isoforme	Inducteurs
CYP1A1	β -naphthoflavone
CYP2B1/CYP2B2	Phénobarbital
CYP2E1	Éthanol
CYP3A1/2	Déxaméthasone

2.2.2.2.5 Inhibition des CYP450s

Le CYP450 peut être inhibé par plusieurs types d'agents (ex. : gaz, substances chimiques, médicaments). (Ortiz de Montellano, 1995; Thum et Borlak, 2000; Tableau 2.4). Habituellement, un médicament pouvant inhiber une isoforme spécifique du CYP450 s'avère capable d'inhiber le métabolisme des médicaments étant des substrats de cette isoenzyme

(Berry et Edwards, 2000). Cette inhibition aboutit à l'augmentation de la concentration plasmatique et tissulaire des médicaments et peut engendrer une toxicité, en particulier lorsque ceux-ci se caractérisent par un index thérapeutique étroit (Wandel et al., 2000; Berry et Edwards, 2000).

Tableau 2.4 : Liste d' inhibiteurs généraux des isoformes du CYP450 chez le rat. DDEP : 3,5-dicarbethoxy-2,6-diméthyl-4-éthyl-1,4-dihydropyridine (Ortiz de Montellano et al., 1995).

Inhibiteur	Structure chimique	Isoforme
Monoxyde de carbone	$\text{C}=\text{O}$	Toutes
Allylisopropyl-acétamide		Plusieurs (2B1, 2C11, 3A, 2C6)
1-Aminobenzotriazole		Plusieurs (2C11, 2B1, 3A, 2C6)

2.2.3 Métabolisme de phase 2

Lors des réactions de phase 2, la molécule originale ou le métabolite de phase 1 est conjugué à des composés endogènes de haute polarité. Les métabolites obtenus se montrent alors plus hydrosolubles et donc plus facilement excrétables (Meeks et al., 1991; Berry et Edwards, 2000). Les réactions les plus importantes de biotransformation de phase II des xénobiotiques sont la glucuronidation, la sulfatation, la conjugaison du glutathion et l'acétylation, catalysées par différentes enzymes de conjugaison, soit respectivement les uridine diphosphate glucuronyltransférases (UDP-glucuronyltransférases), les sulfotransférases, les glutathion S-transférases (GST) et les N-acétyltransférases.

2.2.4 Métabolismes de phase 3 et 4

Alors que le métabolisme de phase 3 se rapporte au transport intracellulaire cytoplasmique des xénobiotiques vers l'excrétion, la quatrième phase concerne l'élimination extracellulaire des métabolites des phases précédentes; elle est assurée par différentes protéines de transport, principalement les P-glycoprotéines (P-gps) et les « multidrug resistance-associated proteins » (MRPs). Il s'agit de protéines membranaires intégrales appartenant à la superfamille des ATPases « ATP-binding cassette » (ABC), et qui utilisent donc l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP afin d'expulser activement leurs substrats à l'extérieur des cellules. Exprimés entre autres au niveau du domaine canaliculaire des hépatocytes, ces transporteurs s'avèrent impliqués dans le passage transmembranaire des xénobiotiques (en particulier les médicaments) ou de leurs métabolites dans la bile et dans l'urine (Wandel et al., 2000; Fardel et al., 2002; Petzinger et Geyer, 2006).

2.3 Bioactivation

La séquence d'oxydation-conjugaison des xénobiotiques est habituellement nommée détoxification métabolique, un processus responsable de débarrasser l'organisme des xénobiotiques potentiellement toxiques (Ryan et Levin, 1990; Berry et Edwards, 2000). Cependant, au cours des réactions de phase I, plusieurs composés chimiques peuvent être activés en métabolites électrophiles hautement réactifs, plus toxiques que la substance initiale : on parle alors de bioactivation. Ces électrophiles peuvent réagir chimiquement avec les macromolécules essentielles au fonctionnement normal de la cellule (protéines, ARN ou ADN) (Ryan et Levin, 1990; Meeks et al., 1991). Si ces métabolites ne sont pas rendus moins réactifs par conjugaison avec des composés polaires suite aux réactions du métabolisme de phase II, ce qui se produit lorsqu'ils se retrouvent en trop grande concentration par rapport aux antioxydants endogènes (ex. : GSH) et aux activités des enzymes les générant, c'est alors que ces interactions auront lieu et mèneront à la perte des fonctions cellulaires normales et à une toxicité (Meeks et al., 1991).

Puisque la biotransformation se déroule principalement au niveau des hépatocytes, ces cellules s'avèrent la principale cible des électrophiles générés par la biotransformation

des xénobiotiques (Meeks et al., 1991; Berry et Edwards, 2000). Si ces métabolites réactifs s'y accumulent de façon trop importante, ils vont mener à la mort des hépatocytes.

CHAPITRE III

MORT CELLULAIRE

3.1 Généralités sur l'apoptose

Décrite pour la première fois par Kerr et ses collègues en 1972, l'apoptose tire son nom du grec et réfère à la chute programmée des feuilles des arbres (Schattenberg et al., 2006; Huerta et al., 2007). Elle se définit comme un mécanisme de mort cellulaire active fortement préservé, observé chez presque tous les organismes pluricellulaires, hautement contrôlé car orchestré par la cellule elle-même, et se fait parfois appeler « suicide cellulaire » (Schattenberg et al., 2006; Huerta et al., 2007). L'apoptose se caractérise en fait par l'activation d'une machinerie interne complexe et finement régulée par des gènes ou par les protéines qu'ils expriment, dans le cadre d'une cascade d'événements faisant suite à sa stimulation (Yin et Dong, 2003). Chez les cellules de mammifères, l'apoptose peut être déclenchée par un large spectre de stimuli internes (forme intrinsèque de l'apoptose) et externes (forme extrinsèque) (Schattenberg et al., 2006).

La mort cellulaire par apoptose constitue un processus physiologique normal, essentiel à l'homéostasie cellulaire et tissulaire et à la survie de l'organisme (Yin et Dong, 2003 ; Wang et al., 2005; Schattenberg et al., 2006). De plus, elle joue un rôle de protection par le retrait des cellules dysfonctionnelles ou endommagées suite, par exemple, à une infection virale ou à l'exposition à la lumière ultraviolette; également, l'apoptose permet d'éliminer les cellules tumorales (Valen, 2003 ; White, 2006).

Il existe un autre type majeur de mort cellulaire appelé nécrose et qui, contrairement à l'apoptose, s'avère accidentel, désordonné, et subi par la cellule lors d'un stress majeur ayant causé un dommage irréparable (Krauss, 2001 ; Figure 3.1).

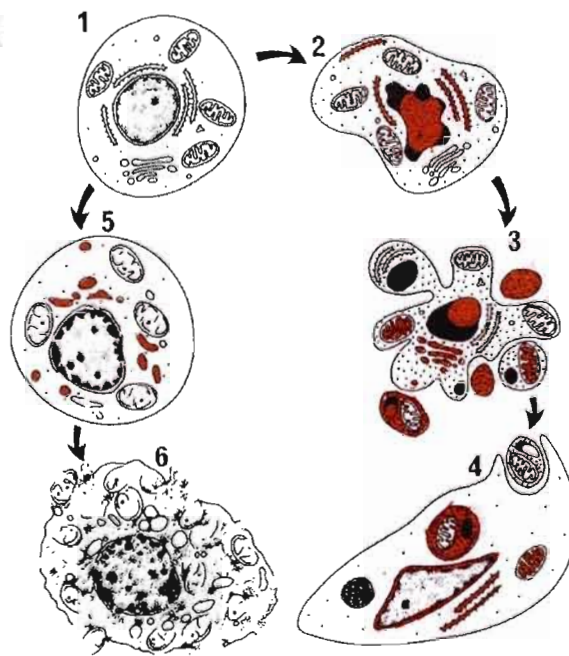
3.2 Apoptose versus nécrose

La nécrose et l'apoptose se distinguent nettement par les caractéristiques

biochimiques et morphologiques qui les définissent (Tomei et Cope, 1991 ; Sartorius et al., 2001 ; Figure 3.1). Ainsi, au cours de la nécrose, la cellule et les organelles se gonflent et la membrane finit par éclater, déversant son contenu dans le milieu et provoquant une inflammation aiguë, ce qui affecte les cellules voisines et mène très souvent à leur mort (Kam et Ferch, 2000 ; Kroemer et al., 2007). De plus, l'ADN nucléaire est dégradé de façon aléatoire (Tomei et Cope, 1991).

Dans le cas de l'apoptose, le noyau et le cytoplasme se condensent, et la cellule rétrécit de manière significative; la chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 paires de bases, et l'ADN est fragmenté aux emplacements internucléosomiaux (Wyllie et al., 1984 ; Tomei et Cope, 1991). Il y a ensuite bourgeonnement de la membrane plasmique (formation de « blebs ») et fragmentation de la cellule avec pour conséquence la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme. La membrane ne se désintègre pas, et les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés par les macrophages ou les cellules avoisinantes, ce qui évite une réponse inflammatoire, donc un dommage cellulaire collatéral (Jaeschke et al., 2004; Schattenberg et al., 2006). De plus, biochimiquement, on observe entre autres la translocation, par les flippases, de la phosphatidylsérine du côté interne de la membrane plasmique vers la face externe (Zörnig et al., 2001). Il s'agit en fait pour la cellule d'un moyen de signaler son état apoptotique à son environnement dans le but de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes (Zörnig et al., 2001).

Les changements morphologiques observés lors de la mort apoptotique résultent de l'activation d'une famille de protéases nommées caspases, qui induisent la dégradation de protéines structurales et d'enzymes de réparation de l'ADN (Jaeschke et al., 2004 ; Wang et al., 2005).



NÉCROSE APOPTOSE

Figure 3.1 : L'apoptose versus la nécrose. L'apoptose se distingue de la nécrose par des caractéristiques morphologiques et biochimiques. (1) Cellule normale. (2) Condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN; condensation du noyau et du cytoplasme. (3) Bourgeonnement de la membrane plasmique (formation de «blebs») et fragmentation de la cellule : formation de corps apoptotiques. (4) Phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages ou les cellules avoisinantes. (5) Dégradation aléatoire de l'ADN nucléaire; gonflement de la cellule et des organelles. (6) Désintégration de la membrane plasmique, éclatement de la cellule et réaction inflammatoire (Tomei et Cope, 1991).

3.3 Les caspases

3.3.1 Généralités

Les caspases (pour « cysteine aspartyl proteases ») constituent une famille de protéases à cystéine, c'est-à-dire qu'elles utilisent le résidu cystéine de leur site actif pour cliver leurs substrats; ce clivage s'effectue spécifiquement du côté carboxyl des résidus aspartate (Wilson, 1998; Yin et Dong, 2003). Ces protéines intracellulaires s'avèrent les principaux acteurs de l'apoptose, étant impliquées dans son initiation et son exécution; une fois activées, les caspases dites initiateurs peuvent activer, en cascade, les caspases

effectrices situées en aval (Mirkes, 2002; Yin et Dong, 2003; Wang et al., 2005). Les caspases effectrices clivent ensuite divers substrats intracellulaires, ce qui aboutit ultimement à toutes les altérations morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose, menant donc à une mort cellulaire inévitable (Thornberry et Lazebnik, 1998; Wang et al., 2005).

À ce jour, 14 caspases ont été caractérisées, bien que toutes ne jouent pas un rôle dans l'apoptose. Ainsi, parmi celles associées à cette mort cellulaire, les caspases -2, -8, -9, -10 sont initiatrices et les caspases -3, -6, et -7, effectrices. Quant aux caspases -1, -4, -5, -11, -13 et -14, elles sont impliquées dans le processus inflammatoire (maturation des cytokines). De plus, la caspase-12 a été identifiée à la fois comme apoptotique (initiatrice) et inflammatoire (Martinon et al., 2002; Wang et al., 2005; Huerta et al., 2007; Figure 3.2).

3.3.2 Structure et activation des caspases

Toutes les caspases partagent des similarités importantes dans leur séquence d'acides aminés, leur structure et leur spécificité de substrat (Wang et al., 2005). Elles existent initialement dans les cellules sous forme de proenzymes ou procaspases inactives. Suite à l'induction de l'apoptose, ces proenzymes peuvent être clivées au niveau du site protéolytique, un résidu aspartate interne, et ainsi devenir activées. Les procaspases sont constituées d'une seule chaîne (30-50 kDa) contenant trois domaines principaux: un pro-domaine NH₂-terminal de longueur variable, une grande sous-unité β (p20 : environ 20 kDa), et une petite sous-unité α (p10 : environ 10 kDa) (Wang et al., 2005; Figure 3.3). En particulier, la petite et la grande sous-unité se caractérisent par un degré élevé d'homologie entre les caspases. Après coupure du pro-domaine, les deux sous-unités s'associent afin de former un tétramère $\alpha_2\beta_2$ actif (Thornberry et Lazebnik, 1998; Figure 3.3).

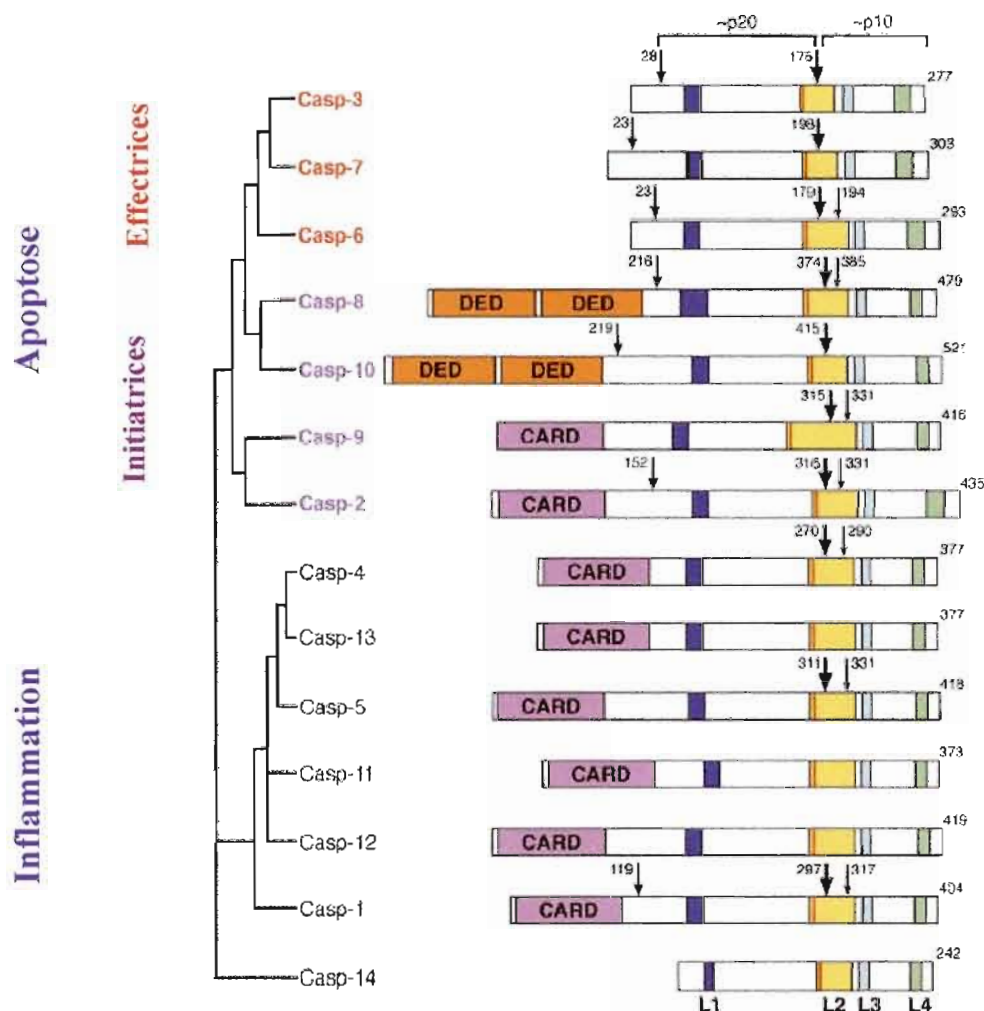


Figure 3.2 : Classification des caspases. Les 14 caspases connues jouent un rôle soit dans l'apoptose, soit dans l'inflammation. Parmi les caspases impliquées dans l'apoptose, certaines sont initiatrices et d'autres effectrices. À noter que la caspase-12, présentée sur ce schéma comme jouant un rôle dans l'inflammation, est en fait également une caspase initiatrice impliquée dans l'apoptose. Par ailleurs, alors que la grande flèche indique le clivage protéolytique entre la grande et la petite sous-unité, les flèches moyennes et petites correspondent à des sites additionnels de clivage. De plus, les symboles L1 à L4 représentent les loupes de surface formant le site catalytique, et la ligne rouge au début de L2 indique le résidu cystéine du site catalytique. Enfin, DED et CARD correspondent à des domaines permettant le recrutement des caspases dans des complexes d'activation, par interaction homologue avec d'autres protéines. DED : «Death Effector Domain»; CARD : «Caspase Recruitment Domain» (Adapté de Shi, 2002).

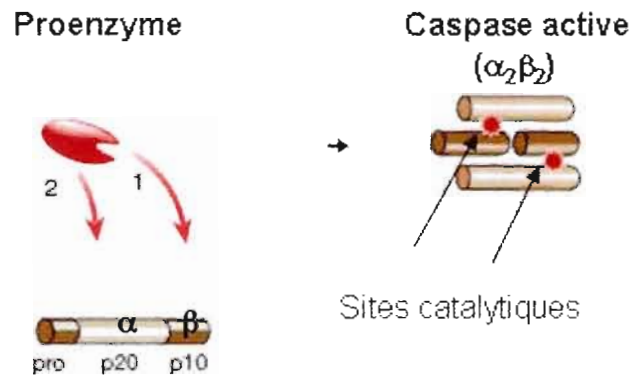


Figure 3.3 : Activation des caspases. Les caspases sont constituées de trois domaines principaux (prodomaine; domaine p20 ou β ; domaine p10 ou α) qui sont clivés en deux étapes pour donner une caspase mature et active $\alpha_2\beta_2$. Pro : Prodomaine (Adapté de Hengartner, 2000).

3.4 Voies d'activation des caspases

3.4.1 La voie mitochondriale

Plusieurs formes de stress cellulaire (ex. : dommage à l'ADN; exposition aux radiations ionisantes) provoquent un dommage aux mitochondries menant à une chute de leur potentiel transmembranaire (Huerta et al., 2007). Il s'en suit une perméabilisation des membranes externes des mitochondries, ce qui permet à certaines molécules apoptogènes telles que le cytochrome c (cyto c), « Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP binding protein with low pI » (Smac/Diablo) et l'« Apoptosis-Inducing Factor » (AIF) d'être libérées dans le cytosol depuis l'espace intermembranaire mitochondrial (Huerta et al., 2007; Kroemer et al., 2007).

Après sa libération, le cytochrome c se lie à la protéine « Apoptosis Protease Activating Factor-1 » (Apaf-1) ce qui permet, en présence de déoxyadénosinetriphosphate (dATP), l'activation de l'Apaf-1. Les molécules de procaspase-9 peuvent ensuite se lier à

(CARD) des deux protéines (Wang et al., 2005; Huerta et al., 2007; Figure 3.4). La formation de ce complexe de haut poids moléculaire, nommé apoptosome, promeut l'auto-activation de la caspase-9 (Wang et al., 2005; Huerta et al., 2007).

La caspase-9 peut ensuite activer les caspases -3, -6 et -7 effectrices, lesquelles iront cliver leurs substrats (ex. : Inhibiteur de la «Caspase Activated DNase» ou ICAD; Gas 2), menant à la destruction de la cellule. L'inhibiteur de caspases «X inhibitor of apoptosis protein» (XIAP) s'associe aussi à l'apoptosome et inhibe l'activité des caspases -3, -6 et -7. Toutefois, Smac/Diablo se lie à l'IAP et promeut l'apoptose par antagonisme de l'activité de l'«Inhibitor of apoptosis protein» (IAP). Également, l'AIF est transloqué du cytosol au noyau où il favorise la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine (Wang et al., 2005; Kroemer et al., 2007; Figure 3.4).

Par ailleurs, la régulation de la voie mitochondriale s'effectue principalement par l'entremise des protéines de la famille «**B-cell lymphoma-2**» (Bcl-2) (Yin et Dong, 2003). Localisées dans les mitochondries, elles peuvent inhiber ou promouvoir la libération de facteurs apoptogènes dans le cytosol. Cette famille se compose de membres pro-apoptotiques (Bax, Bid, Bcl-x_S, etc.) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L, etc.) (Yin et Dong, 2003).

3.4.2 La voie des récepteurs de mort

La voie des récepteurs de mort implique l'intervention de récepteurs membranaires à cytokine faisant partie de la superfamille des récepteurs «**Tumor Necrosis Factor Receptor**» (TNF-R), et les mieux caractérisés sont TNF-R1 et Fas (CD95) (Wang et al., 2005). Il s'agit de protéines transmembranaires partageant, au sein de leur queue cytoplasmique, un domaine d'interactions protéiques nommé domaine de mort («**Death Domain**» (DD)) (Micheau, 2004; Wang et al., 2005). L'association du récepteur (ex. : Fas) avec son ligand correspondant (ex. : FasL) par le DD mène à son activation (Yin et Dong, 2003). Il y a ensuite recrutement d'une protéine adaptatrice, par exemple «**Fas-Associated Death Domain**» (FADD), qui possède un domaine de mort en C-terminal qui se lie à celui de Fas, et un domaine effecteur de mort («**Death Effector Domain**» (DED)) en N-terminal. La

molécule adaptatrice recrute et se lie à la procaspase-8 ou -10 par le DED de celle-ci, formant ainsi le complexe « **Death-Inducing Signaling Complex** » (DISC) (Mirkes, 2002; Wang et al., 2005; Figure 3.4). À l'intérieur du DISC, la procaspase-8 est autoprotéolysée pour former la caspase-8 active; celle-ci pourra ensuite activer directement les caspases effectrices -3, -6 et -7, qui vont cliver des protéines cellulaires essentielles (ex. : ICAD, actine) (Wang et al., 2005; Figure 3.4). L'activation de la caspase-8 peut être inhibée par l'homologue de caspase dégénéré «c-FLICE inhibitory protein» (c-FLIP) (Hengartner, 2000; Figure 3.4).

3.4.3 Le pont entre la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale

Habituellement, il ne résulte de l'activation de la caspase-8 par la voie des récepteurs de mort qu'une faible quantité de caspase-8 active. La protéine pro-apoptotique Bid, retrouvée normalement dans le cytosol, peut servir de connecteur entre la voie des récepteurs et la voie mitochondriale et permettre ainsi d'augmenter la quantité de caspase active, donc d'amplifier la cascade apoptotique (Yin, 2000 ; Wang et al., 2005). En fait, Bid peut être clivée par la caspase-8 activée par la voie des récepteurs. Après clivage, le fragment C-terminal de Bid, nommé Bid tronqué ou tBid, est transloqué à la mitochondrie; au niveau de cette organelle, tBid active Bax, induisant la libération du cytochrome c dans le cytosol (Yin, 2000 ; Wang et al., 2005 ; Figure 3.4).

Plusieurs substances exogènes peuvent provoquer la mort des hépatocytes par nécrose ou apoptose; en particulier, l'hépatotoxicité médicamenteuse, dont il sera question dans le chapitre qui suit, s'avère une cause courante de mort cellulaire.

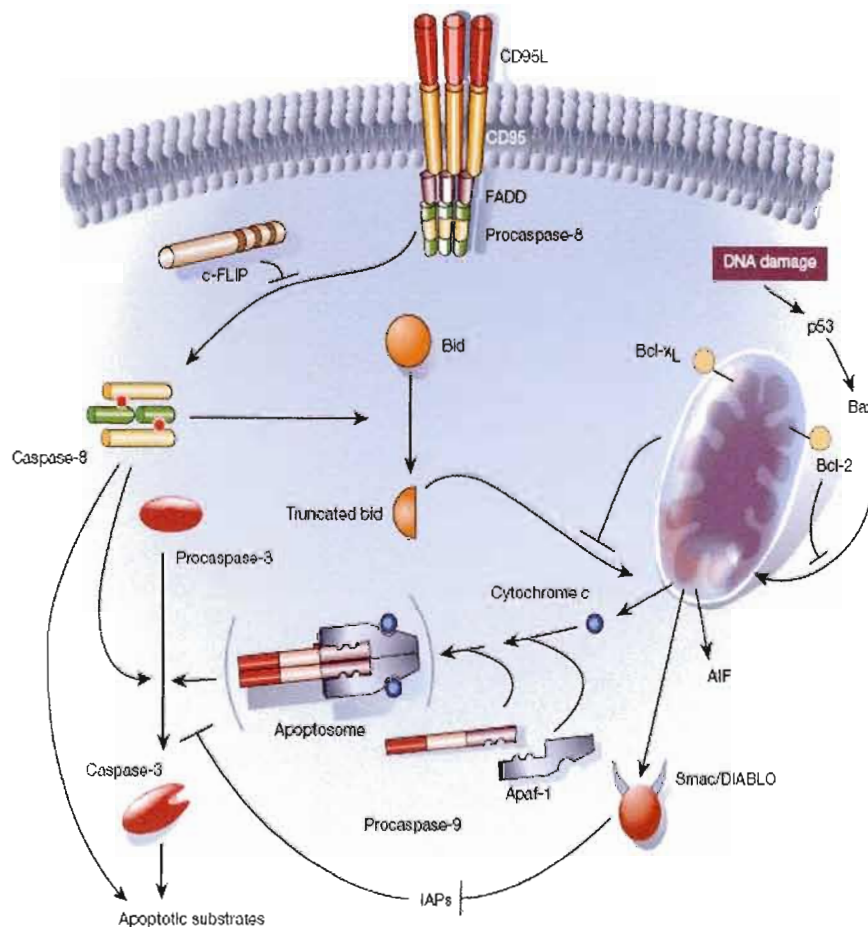


Figure 3.4: Les deux principales voies d'activation des caspases chez les mammifères. Dans la voie des récepteurs, la caspase-8 est activée par des récepteurs de mort (ex. : CD95) par l'entremise d'une protéine adaptatrice (ex. : FADD), et elle active directement la caspase-3 effectrice, qui va cliver ses substrats. L'activation de la caspase-8 peut-être bloquée par le recrutement c-FLIP. La voie mitochondriale est quant à elle activée suite à un stress cellulaire qui déclenche le déplacement de Bax du cytosol à la mitochondrie, ce qui favorise la translocation du cytochrome c au cytosol; aussi, les membres anti-apoptotiques (ex. : Bcl-2 et Bcl-x_L) de la famille Bcl-2 compétitionnent avec Bax à la surface mitochondriale afin de réguler cette libération. Une fois dans le cytosol, le cytochrome c se lie à l'Apaf-1 et à la caspase-9 pour former l'apoptosome, qui active la caspase-3. Cette activation est antagonisée par les IAPs, elles-mêmes antagonisées par les Smac/DIABLO. Également, l'AIF est transloqué du cytosol au noyau où il favorise la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine. De plus, il existe un pont entre ces deux voies via le clivage de Bid par la caspase-8 qui augmente son activité apoptotique et mène à sa translocation dans les mitochondries, d'où il promeut la sortie de cytochrome c. FADD : «Fas-associated death domain» ; IAP : «Inhibitor of apoptosis protein»; Smac/DIABLO: «Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP binding protein with low pI»; AIF: «Apoptosis-inducing factor» (Hengartner, 2000).

CHAPITRE IV

HÉPATOTOXICITÉ DES MÉDICAMENTS

4.1 Généralités

L'hépatotoxicité induite par les médicaments constitue un problème majeur de santé publique dans la majorité des pays occidentaux, puisqu'elle y représente la principale cause d'insuffisance hépatique aiguë (IHA) (Keeffe, 2005). En fait, les médicaments, en particulier l'acétaminophène (près de 50% des occurrences), seraient responsables de 10-52 % des cas d'IHA (Motluk, 2005; Larrey et Pageaux, 2005; Larson et al., 2005). De plus, l'incidence d'hépatotoxicité médicamenteuse a récemment été estimée à 14 sur 100 000 habitants (Larrey et Pageaux, 2005). De plus, le taux de mortalité spontanée dépasse souvent 75% (Larrey et Pageaux, 2005). La transplantation hépatique orthotopique s'avère toutefois l'option thérapeutique ultime une fois le stade de l'insuffisance hépatique atteint (Larrey et Pageaux, 2005; Kozin et Reddy, 2006); elle est normalement associée à un taux moyen de survie de 55% après un an (Sanap et al., 2002) et de 65-70 % après 5 ans, dans le cas d'une hépatite médicamenteuse (Vanlemmens et al., 1996). Aussi un inconvénient majeur émane du manque récurrent de donneurs compatibles pour des allogreffes chez des patients nécessitant ce traitement chirurgical, d'où d'importantes listes d'attente (Vanlemmens et al., 1996). Il faut alors considérer un système de support hépatique bioartificiel extracorporel, mais il ne s'agit que d'une mesure à court terme ne menant à la survie que dans le cas d'une récupération spontanée du foie ou de son remplacement (Yoshiba et al., 1996; Draganov et al., 2000; Rosenthal, 2006). Ceci accroît l'incidence de mortalité.

4.2 L'hépatotoxicité médicamenteuse : prévisible ou imprévisible

Les médicaments pouvant endommager le foie sont habituellement catégorisés comme des agents hépatotoxiques intrinsèques (ex. : acétaminophène, tétrachlorure de carbone) ou des composés idiosyncrasiques (ex. : pénicilline, chlorpromazine), selon que la toxicité provoquée s'avère respectivement prévisible ou imprévisible (Meeks et al., 1991;

Plaa et Hewitt, 1998; Tableau 4.1). En fait, les atteintes médicamenteuses prévisibles se distinguent des atteintes imprévisibles par différents critères. Ainsi, dans le cas d'une toxicité intrinsèque, un grand nombre de sujets prenant se trouvent atteints, il existe une relation entre la dose et la toxicité, et l'hépatotoxicité se montre reproductible (Meeks et al., 1991; Plaa et Hewitt, 1998; Tableau 4.1). Au contraire, les dommages hépatiques idiosyncrasiques se produisent seulement chez un faible pourcentage de sujets exposés à un médicament. De plus, il n'y aucune relation entre la dose et l'effet, et l'hépatotoxicité n'est pas reproductible chez l'animal (Plaa et Hewitt, 1998; Tableau 4.1). Cette toxicité imprévisible peut correspondre : à un mécanisme immunologique dirigé contre les métabolites hépatiques du médicament; à un polymorphisme ou une mutation génique individuelle qui accélère ou induit la production de métabolites toxiques; ou même aux deux mécanismes à la fois (Plaa et Hewitt, 1998).

Tableau 4.1 : Hépatotoxicité intrinsèque et idiosyncrasique

Base de l'atteinte hépatique	Reproductibilité expérimentale	Dépendance à la dose	Incidence chez l'humain	Périodes de latence
Hépatotoxicité intrinsèque (agents hépatotoxiques prévisibles)	Oui ¹	Oui	Élevée	Souvent courtes et relativement uniformes
Réaction idiosyncrasique (agents hépatotoxiques imprévisibles)	Non	Non	Faible	Souvent longues et variables

(Adapté de Plaa et Hewitt, 1998).

4.3 Les différentes formes d'hépatopathies médicamenteuses

Les dommages hépatiques mènent à des syndromes aiguës ou chroniques (Meeks et al., 1991; Plaa et Hewitt, 1998; Tableau 4.2). D'une part, les atteintes aiguës peuvent s'avérer cytotoxiques (cytolytiques), c'est-à-dire caractérisées par un dommage important aux hépatocytes), cholestatiques (manifestées par un arrêt du flux biliaire et une jaunisse ou

ictère), ou une combinaison des deux. Les lésions cytotoxiques se caractérisent par une nécrose, une stéatose ou les deux (Meeks et al., 1991; Plaa et Hewitt, 1998; Tableau 4.2).

Tableau 4.2 : Principales hépatopathies médicamenteuses : Pathogenèse et exemples de causes.

Domage	Médicament (Exemple)	Pathogenèse
Hépatopathies aiguës		
Lésion hépatocellulaire aiguë		
-Nécrose toxique	Acétaminophène	-Dommages membranaires; liée à la dose
-Stéatose	Tétracycline	-Surcharge en graisse dans les hépatocytes
Cholestase		
-Inflammation	Ajmaline	-Jaunisse obstructive; inflammation périportale et cholestase
-Pure	Stéroïdes anabolisants	-Jaunisse obstructive; sans inflammation
-Mixte	Sulindac	-Jaunisse obstructive ou hépatite
Hépatopathies chroniques		
Hépatite chronique	Méthyl dopa	-Idiosyncrasie
Cholestase chronique	Chlorpromazine	-Inconnue, rare
Stéatose chronique	Asparaginase	-Stéatose alcoolique le plus souvent
Fibrose/cirrhose	Méthotrexate	-Liée à la dose; dommages métaboliques toxiques insidieux
Tumeurs : néoplasmes	Contraceptifs oraux	-Inconnue

(Adapté de Plaa et Hewitt, 1998; Thomson et Shaffer, 2005).

Les nécroses toxiques hépatiques sont intrinsèques, entraînent une réaction inflammatoire et mènent normalement à une jaunisse hépatocellulaire. De plus, les cas sévères peuvent aboutir à une insuffisance hépatique aiguë (Meeks et al., 1991). Quant aux stéatoses aiguës, elles sont microvésiculaires (formation de plusieurs petites vacuoles dans le cytoplasme), et se caractérisent par un pronostic grave (Meeks et al., 1991; Plaa et Hewitt, 1998).

Les lésions cholestatiques s'apparentent à une jaunisse obstructive extrahépatique dans leurs manifestations cliniques (ictère, prurit) et leurs paramètres biochimiques (Plaa et Hewitt, 1998). De façon générale, avec un taux de mortalité inférieur à 1%, la cholestase est associée à un pronostic bien plus favorable que la cytolyse (Plaa et Hewitt, 1998).

Par ailleurs, parmi les atteintes hépatiques chroniques, on retrouve principalement les hépatites chroniques actives, les stéatoses, les cholestases, les fibroses, plusieurs formes de cirrhoses, et les néoplasmes (tumeurs) hépatiques (Meeks et al., 1991; Plaa et Hewitt, 1998; Tableau 4.2). Les stéatoses chroniques sont surtout macrovésiculaires (formation de larges vacuoles cytoplasmiques) et dues à la consommation excessive d'alcool. Pour sa part, la fibrose se présente comme une prolifération excessive de la matrice extracellulaire de composition altérée en réponse à une agression chronique du foie, peu importe sa cause (ex. : alcoolisme chronique et hépatites chroniques virales C), et sa progression mène à long terme à une cirrhose (Meeks et al., 1991; Albanis et Friedman, 2001). L'apparition de celle-ci peut aboutir au développement d'un carcinome hépatocellulaire (Meeks et al., 1991; L'Herminé et al., 1994).

4.4 Surdoses médicamenteuses

Lorsque consommés aux doses recommandées, la plupart des médicaments se montrent inoffensifs pour le foie. Cependant, s'il y a surdosage, ils peuvent alors exercer une action hépatotoxique (Plaa et Hewitt, 1998); la surdose s'avère soit aiguë, soit chronique (Gyamlani et Parikh, 2002). D'une part, la surdose aiguë se rapporte à l'ingestion unique d'une quantité importante de médicament dépassant largement le seuil de toxicité, et

s'explique souvent par une tentative de suicide (Lifshitz et Gavrilov, 2002; Hamanaka, 2005). D'autre part, la forme chronique est due à l'usage répété et à long terme de doses thérapeutiques et surtout suprathérapeutiques modérément élevées d'un composé pharmaceutique dans le but, habituellement, d'augmenter l'effet désiré; elle se montre le plus souvent de cause accidentelle (Meredith et al., 1995; Gyamlani et Parikh, 2002). Toutefois, dans les deux cas, le développement d'une cytolyse hépatique peut aboutir à une nécrose complète se traduisant par une insuffisance hépatique (Thomson et Shaffer, 2005).

4.5 Insuffisance hépatique

4.5.1 Généralités

L'insuffisance hépatique, ou insuffisance hépatocellulaire, se définit comme l'incapacité du foie à remplir ses fonctions (Thomson et Shaffer, 2005); elle peut être aiguë ou chronique (Ostapowicz et al., 2002). Alors que la forme aiguë se rapporte à la détérioration rapide des fonctions hépatiques chez un individu au foie auparavant normal (le plus souvent par atteinte cytolytique ou infection virale à l'hépatite) (Larsen et al., 2002; Thomson et Shaffer, 2005), l'insuffisance hépatocellulaire chronique implique une manifestation plus tardive de l'affectation et est causée par à un endommagement progressif du foie causé surtout par une cirrhose (Ostapowicz et al., 2002; Thomson et Shaffer, 2005; Seiler et al., 2006). De plus, les insuffisances hépatocellulaires aiguë et chronique s'avèrent associées à une morbidité et une mortalité élevées (Rahman et Hodgson, 1999). En particulier, l'insuffisance hépatique aiguë implique généralement un taux de mortalité variant entre 45 et 95% selon l'étiologie (Fingerote et Bain, 1993; Caraceni et Van Thiel, 1995). Elle se manifeste cliniquement par l'apparition d'une encéphalopathie associée à de nombreux de signes qui témoignent d'une nécrose hépatocytaire, dont un ictère, une coagulopathie et des troubles métaboliques (alcaloses mixtes surtout).

4.5.2 Les différentes causes d'insuffisance hépatique aiguë

Il existe plusieurs causes à l'insuffisance hépatique aiguë, mais l'hépatotoxicité due à l'ingestion d'acétaminophène, qui est considérée comme intrinsèque, et les réactions médicamenteuses idiosyncrasiques s'avèrent les plus communes en Occident (Ostapowicz et

Lee, 2000). Par exemple, elles représentent aux États-Unis plus de 50% des cas, dont 42% se rapportent à l'intoxication par l'acétaminophène, et 12% concernent les réactions médicamenteuses idiosyncrasiques, alors que 20% des cas demeurent d'étiologie indéterminée (Lee, 2003a). Dans les pays en développement, ce sont les infections au virus de l'hépatite B qui dominent comme causes d'insuffisance hépatocellulaire aiguë dû à leur importante prévalence (Deepak et Patel, 2006).

En plus de l'acétaminophène, plusieurs médicaments de prescription tels que des salicylates (ex. : acide acétylsalicylique), des antiviraux (ex. : fialuridine) et des antidiabétiques (ex. : troglitazone) (Daum et al., 1976; Kleiner et al., 1997; Chang et Schiano, 2007) sont impliqués dans le développement de l'insuffisance hépatique aiguë ; il en est de même des drogues illicites (ex. : «Ecstasy» ou 3,4-méthylènedioxyméthamphétamine [MDMA], cocaïne) (Jones et Simpson, 1999 ; Mokhlesi et al., 2004). Des réactions médicamenteuses idiosyncrasiques peuvent se produire avec toute médication mais, heureusement, celles-ci ne mènent que rarement à une hépatotoxicité aiguë (Roth et al., 2003 ;Thomson et Shaffer, 2005).

4.6 Interactions médicamenteuses pharmacocinétiques

Les médicaments peuvent interagir entre eux, ce qui résulte normalement en de sérieuses conséquences pharmacologiques et/ou toxicologiques (Berry et Edwards, 2000). Ces interactions sont dues principalement à un phénomène connu sous le nom d'«interactions médicamenteuses pharmacocinétiques», qui se définit comme l'altération de la clairance métabolique d'un médicament par un médicament co-administré. Elles ont surtout lieu pendant la phase de métabolisme faisant suite à l'administration du médicament, et se rapportent particulièrement à la capacité de celui-ci à modifier le métabolisme d'un autre médicament. Ceci peut être dû à l'induction ou à l'inhibition des enzymes du métabolisme des médicaments, en particulier les isoenzymes du CYP450, et peut conduire à de graves conséquences cliniques allant parfois jusqu'à la mort (Berry et Edwards, 2000).

CHAPITRE V

MÉTABOLISME ET HÉPATOTOXICITÉ DES MÉDICAMENTS ÉTUDIÉS : LE TYLÉNOL^{MD}, LE MINTEZOL^{MD} ET LE POSICOR^{MD}

5.1 Le Tylénol^{MD}

5.1.1 Généralités

Le Tylénol^{MD} (Mc Neil Consumer and Speciality Pharmaceuticals, Fort Washington, États-Unis) (Figure 5.1) est un analgésique et antipyrétique (Prescott, 2000 ; Dyke et al., 2007) non-opioïde (Bertolini et al., 2006; Yomiya, 2007) et non-salicylé (Beaven et al., 1976) disponible en vente libre, et il s'agit du plus employé à travers le monde (Bae et al., 2001; Bertolini et al., 2006). Son principe actif, un dérivé acétanilide (4'-hydroxyacétanilide) (Dietze et al., 1997; Larsen et al., 2000), porte pour nom générique acétaminophène (« United States Adopted Name » ou USAN) ou paracétamol (« International Nonproprietary Name » ou INN) (Bradley, 1996), deux dénominations provenant du nom chimique du composé actif, le N-acétyl-para-aminophénol (APAP) (Plaa et Hewitt, 1998; Kim et Park, 2002). L'APAP est cependant contenu dans plus d'une centaine de produits pharmaceutiques autres que le Tylénol^{MD} et dont plusieurs sont disponibles sans ordonnance (Draganov et al., 2000; Tanne, 2006). Ceci favorise la fréquence des surdoses.

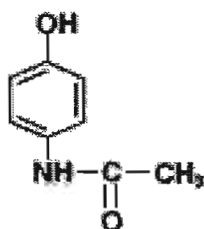


Figure 5.1 : Formule structurale de l'acétaminophène.

Par ailleurs, la dose maximale d'APAP recommandée est de 150 mg/kg de masse corporelle ou 4 g/jour (Pirmohamed et al., 1998 ; Draganov et al., 2000; Tanne, 2006), mais on observe normalement une hépatotoxicité sévère à partir de l'ingestion de 350 mg/kg (Bae

et al., 2001) ou d'une prise unique de 10g (Thomson et Shaffer, 2005; Motluk, 2005).

Ingéré aux doses thérapeutiques, l'APAP est généralement bien supporté (Latchoumycandane et al., 2007). Cependant, un surdosage chronique ou aiguë représente un risque important de dommages au foie, et induit très souvent une insuffisance hépatique (Park et al., 2005; Latchoumycandane et al., 2007). Dans des cas sévères, les surdoses d'acétaminophène peuvent même conduire à la mort (Thomas, 1993; Bae et al., 2001).

5.1.2 Métabolisme

Le métabolisme de l'APAP (Figure 5.2) est principalement hépatique. Normalement, une fois dans l'organisme, ce médicament se trouve largement métabolisé par les processus de phase II (Nelson, 1990; Pirmohamed et al., 1998). Ainsi, il est biotransformé à 55-60% en conjugués glucuronides, et à 30-35% en conjugués sulfates (Pirmohamed et al., 1998; Senior, 2002). Seulement 5% sont métabolisés par le CYP450, principalement par l'isoforme CYP2E1 (Pirmohamed et al., 1998; Draganov et al., 2000; Sinclair et al., 2000) mais aussi par les isoformes CYP1A2 et CYP3A4 (Pirmohamed et al., 1998; Sinclair et al., 2000; Guengerich, 2006).

La biotransformation par le CYP450 mène le plus souvent à l'oxydation de l'APAP en une quinone-imine, la N-acétyl-para-benzoquinone-imine (NAPQI), un puissant électrophile très toxique pour les cellules hépatiques (Plaa et Hewitt, 1998; Draganov et al., 2000) et normalement converti, par conjugaison au GSH, en dérivé acide mercapturique inactif éliminé dans l'urine (Park et al., 2005; Guengerich, 2006). Cependant, d'autres métabolites peuvent être formés. En particulier, la 3-hydroxylation de l'APAP produit le 3-hydroxyacétanilide (3-OH-APAP), un dérivé non hépatotoxique (Halmes et al., 1998; Park et al., 2005; Guengerich, 2006). Ce régioisomère inhibe par ailleurs le CYP2E1 et s'y lie aussi de façon covalente (Halmes et al., 1998).

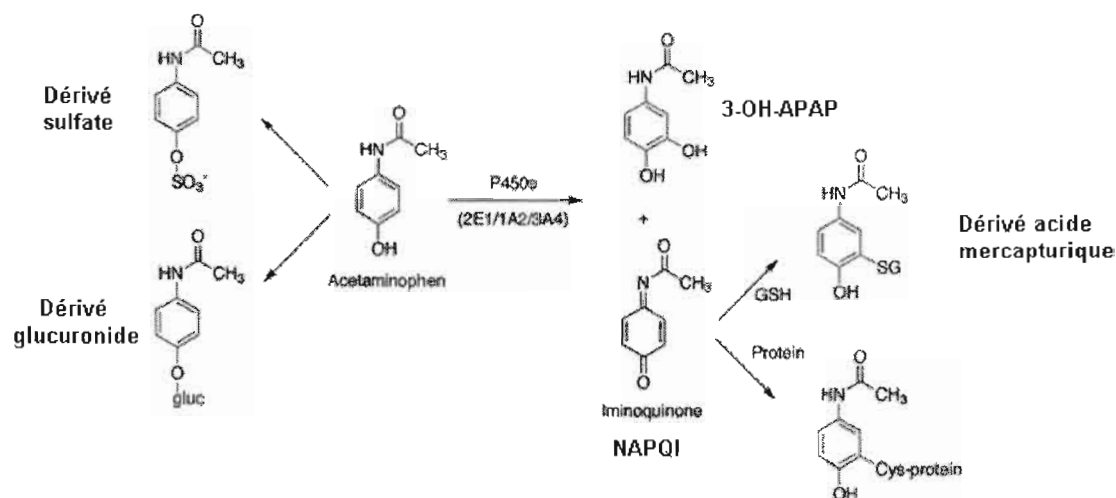


Figure 5.2 : Métabolisme de l'APAP. L'APAP est principalement métabolisé en composés glucuronides (35%) et sulfates (60%) excrétés dans l'urine principalement, et 5% seulement sont biotransformés par le CYP2E1 surtout, le CYP1A2 et le CYP3A4. Cette biotransformation par les CYP450s produit d'une part le 3-OH-APAP, non toxique et, d'autre part, la NAPQI, une quinone-imine très réactive et toxique. Le NAPQI est converti en dérivé mercapturique inactif par conjugaison avec le GSH. Cependant, celui-ci peut être déplété suite à l'ingestion d'une surdose. Le NAPQI va alors se lier aux résidus cystéine des protéines cellulaires et mener à une nécrose hépatique (Adapté de Guengerich, 2006). NAPQI: N-acétyl-para-benzoquinone-imine; 3-OH-APAP:3-hydroxy-APAP.

5.1.3 Mécanisme d'hépatotoxicité

Une surdose aiguë ou chronique d'APAP conduit normalement à un dommage hépatique se manifestant par une nécrose oncotique centrolobulaire (zone 3). La nécrose se développe particulièrement en zone 3 car c'est à son niveau que se concentre de façon plus importante le système du CYP450 et, conséquemment, le métabolite actif (Mitchell et al., 1974; Plaa et Hewitt, 1998).

Du point de vue mécanistique (Figure 5.3), lorsqu'il y a surdose d'APAP, les voies du sulfate et du glucuronide deviennent saturées (Nelson, 1990; Pirmohamed et al., 1998) et plus d'APAP est métabolisé par le CYP450 pour produire le métabolite réactif NAPQI; par conséquent, les réserves hépatocellulaires de GSH deviennent déplétées (Park et al., 2005).

Le dérivé quinone-imine n'est ainsi plus détoxifié et se lie de façon covalente aux résidus cystéine des protéines cellulaires, y compris à ceux de la membrane plasmique des mitochondries, causant ainsi l'arylation de ces protéines (Park et al., 2005; Jaeschke et al., 2006; Figure 5.3). Ceci mène à l'inhibition de la calcium ATPase (Ca^{2+} -ATPase) et à la libération mitochondriale de calcium, donc à l'augmentation des niveaux de calcium (Ca^{2+}) dans le cytosol (Bae et al., 2001; Jaeschke et al., 2006; Figure 5.3). La liaison du NAPQI aux protéines mitochondriales et l'altération de l'homéostasie calcique auraient pour effet direct la réduction de la respiration mitochondriale (Burcham et Harman, 1991; Jaeschke et al., 2003) et la déplétion de l'ATP (Figure 5.3). De plus, cette dysfonction mitochondriale provoque un stress oxydatif avec génération de quantités importantes de superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Bae et al., 2001; Jaeschke et al., 2003; Figure 5.3). Celui-ci peut former, par l'action de la superoxyde dismutase, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peut amplifier l'oxydation des protéines ou mener à la peroxydation des lipides (LPO); cependant, cette voie s'avérerait peu empruntée (Jaeschke et al., 2003; Denicola et Radi, 2005; Jaeschke et Bajt, 2006). De préférence, le superoxyde réagit avec l'oxyde nitrique (NO) pour former le peroxynitrite (ONOO^-), un puissant agent oxydant et de nitration qui, en absence de GSH, va causer une oxydation et une nitration marquées des protéines mitochondriales au niveau des résidus tyrosine (Jaeschke et al., 2003; Denicola et Radi, 2005; Jaeschke et al., 2006; Figure 5.3).

Ce stress oxydatif mène normalement à l'amplification de la dysfonction mitochondriale et occasionne des dommages irréversibles, soit une transition de perméabilité de la membrane mitochondriale (TPM); celle-ci a pour conséquence la chute du potentiel membranaire mitochondrial et une perte marquée d'ATP (Jaeschke et al., 2003; Figure 5.3). La combinaison de tous ces événements aboutit *in vivo* à la nécrose oncotique centrolobulaire des hépatocytes (Park et al., 2005; Jaeschke et al., 2006).

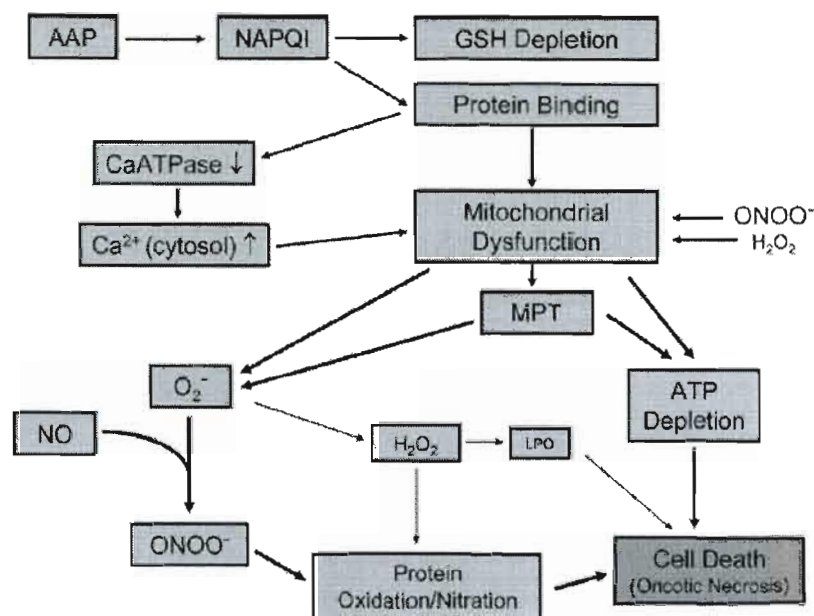


Figure 5.3 : Mécanisme d'hépatotoxicité de l'APAP. L'hépatotoxicité de l'APAP est initiée par la formation du métabolite réactif NAPQI, qui se lie de manière covalente aux protéines cellulaires de la membrane plasmique des mitochondries après avoir déplété les réserves de GSH hépatique. Ceci mène à l'inhibition de la Ca^{2+} -ATPase et à l'augmentation des niveaux de Ca^{2+} cytosolique. La liaison du NAPQI aux protéines des mitochondries et l'altération de l'homéostasie calcique résultent en une dysfonction mitochondriale, avec pour conséquence une déplétion de l'ATP et un stress oxydatif caractérisé par la génération de O_2^- . La réaction de celui-ci avec le NO forme le peroxynitrite, qui provoque une importante oxydation et nitration des protéines. Ce stress oxydatif amplifie la dysfonction mitochondriale et occasionne une transition de perméabilité de la membrane mitochondriale (MPT), d'où une perte marquée d'ATP. Aussi, le O_2^- peut générer le H_2O_2 , qui cause la peroxydation des lipides (LPO), mais cette voie est peu favorisée. La combinaison de tous ces événements a pour conséquence ultime la mort des hépatocytes par nécrose oncotique. AAP : acétaminophène; NAPQI : N-acétyl-para-benzoquinone-imine; GSH : glutathion; Ca^{2+} -ATPase : calcium ATPase; Ca^{2+} : calcium; O_2^- : anion superoxyde; NO : oxyde nitrique; ONOO^- : peroxynitrite; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène; LPO : peroxydation lipidique; MPT : transition de perméabilité de la membrane mitochondriale («mitochondrial membrane permeability transition») (Référence : Jaeschke et al., 2003).

Par ailleurs, le type de mort cellulaire occasionné par l'acétaminophène a en fait été mis en question récemment dû à plusieurs preuves d'une implication de l'apoptose dans des études *in vitro* sur des cellules humaines et animales. Ainsi, plusieurs auteurs ont entre autres

rapporté la libération de cytochrome c des mitochondries au cytosol (Kass et al., 2003; Boulares et Ren, 2004; Fiorucci et al., 2004) et l'activation de caspases (ex. : caspases-3, -7, -8 et -9) par l'APAP (Fiorucci et al., 2004; Macanas-Pirard et al., 2005). Toutefois, il n'existe aucune preuve morphologique d'une implication significative de l'apoptose suite à une surdose d'acétaminophène chez l'humain (Lee, 2003b) et chez les animaux de laboratoire (Gujral et al., 2002). Ainsi, la nécrose représenterait le principal mécanisme de mort hépatocellulaire suite à une surdose d'APAP (Gujral et al., 2002; Bajt et al., 2004)

5.2 Mintezol^{MD}

5.2.1 Généralités

Le Mintezol^{MD} (Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey, États-Unis) (Figure 5.4) est un antiparasitaire antihelminthique délivré uniquement sous prescription médicale, et utilisé pour le traitement des infestations par les vers chez les animaux et l'humain (Horne et al., 2003; Dalvie et al. 2006). De plus, il sert de fongicide en agriculture suite à la récolte des fruits et des légumes (Coulet et al., 2000; Horne et al., 2003; Dalvie et al., 2006), et d'agent de conservation dans l'industrie alimentaire (Rey-Grobellet et al., 1996; Sugihara et al., 1997). Son principe actif est le thiabendazole (Tbz), un dérivé benzimidazole (benzimidazole 2-substitué) ayant pour nom chimique 2-(4'-thiazolyl)-1-H- benzimidazole (Allen et Gootlied, 1970).

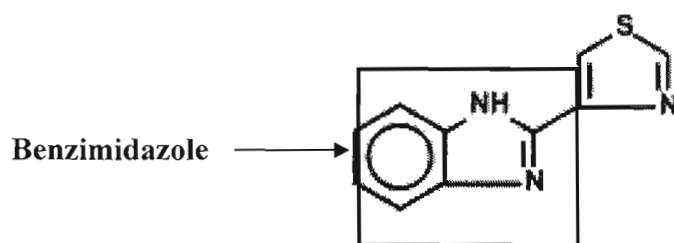


Figure 5.4: Formule structurale du thiabendazole. Le principe actif du Mintezol^{MD} est un dérivé du benzimidazole.

Également, la dose maximale recommandée pour ce médicament est de 3g par jour, ou une seule dose de 50 mg/kg de masse corporelle (Food and Drug Administration, 2003). Bien que considéré comme un composé généralement sécuritaire (Mizutani et al., 1994), on lui associe de nombreux effets secondaires parmi lesquels certains désordres gastrointestinaux. Également, le Mintezol^{MD} doit être utilisé avec précaution en présence d'une dysfonction hépatique (Food and Drug Administration, 2003). Des choléstases intrahépatiques sévères progressant souvent vers des cirrhoses (Mohi-ud-din et Lewis, 2004; Dalvie et al., 2006) et nécessitant parfois une transplantation hépatique orthotopique (i.e. : remplacement du foie malade d'un patient par le foie sain d'un donneur) (Skandrani et al., 1997 ; Gueniche, 2000) ont d'ailleurs été rapportées chez l'humain, bien que le mécanisme exact ne soit pas encore éclairci (Dalvie et al., 2006). Il n'existe toutefois que de rares cas de dommages parenchymateux majeurs ayant mené à une insuffisance hépatique irréversible suite à la prise de ce médicament (Food and Drug Administration, 2003).

5.2.2 Métabolisme et mécanisme d'hépatotoxicité

Chez l'humain, le thiabendazole est métabolisé surtout par le foie (Dalvie et al., 2006), presque entièrement en composés inactifs excrétés principalement par les reins (Bauer et al., 1982; www.fda.gov), mais aussi par la bile (Dalvie et al., 2006). Le principal métabolite est le 5-hydroxythiabendazole (5-OHTbz), formé par l'hydroxylation de l'anneau aromatique catalysée par le CYP1A2 (Coulet et al., 2000; Dalvie et al., 2006; Figure 5.5). Le 5-OHTbz est ensuite converti en un conjugué sulfate ou glucuronide et, après 48 heures, 5% de la dose administrée se retrouvent dans les fèces, et 90% dans l'urine (Food and Drug Administration, 2003; Rey-Grobellet et al., 1996; Dalvie et al., 2006). D'autres métabolites mineurs peuvent être formés; il s'agit surtout du 3-hydroxythiabendazole (3-OHTbz), du 4-hydroxythiabendazole (4-OHTbz), du 2-acétylbenzimidazole, de l'acide N-méthylthiabendazole, et du benzimidazole (Toda et al., 2000; Dalvie et al., 2006; Figure 5.5). Il se produit également l'époxydation du double lien carbone-carbone (C=C) de l'anneau thiazole du thiabendazole et, suite à son hydrolyse subséquente, l'époxyde obtenu se décompose pour former le thioformamide et le benzimidazol-2-ylglyoxal (Coulet et al., 2000).

Par ailleurs, il a été rapporté que le thiabendazole se lie de manière irréversible aux protéines tissulaires par un mécanisme médié par le CYP1A2 (Dalvie et al., 2006), ce qui suggère l'existence d'un intermédiaire réactif électrophile (Coulet et al., 1998); toutefois, sa structure n'a pas encore été identifiée. De plus, le fait que cet intermédiaire puisse être piégé par le GSH confirme qu'il a subi une oxydation pour former une espèce électrophile (Dalvie et al., 2006). Aussi, on observe *in vivo* avec le thiabendazole une augmentation de la déplétion des niveaux de GSH intrahépatique (Mizutani et al., 1990; Figure 5.5), ce qui mène à une plus forte incidence de toxicité (Mizutani et al., 1993); cependant, une hausse de l'activité des GSTs a également été rapportée, ce qui traduit un mécanisme de protection contre le thiabendazole et ses métabolites (Toda et al., 2000; Price et al., 2004; Figure 5.5).

La formation de l'intermédiaire réactif est attribuée à l'activation métabolique du 5-OHTbz en une quinone-imine via l'oxydation par le système du CYP450 ou les peroxydases (Coulet et al., 2000; Dalvie et al., 2006). En fait, le 5-OHTbz subirait d'abord une oxydation à un électron pour générer des espèces radicales, puis une disproportionnation ou une oxydation additionnelle pour donner une quinone-imine (Dalvie et al., 2006). Celle-ci se lierait irréversiblement aux protéines cellulaires (dont celles des mitochondries) suite à une accumulation importante ayant causé la déplétion du GSH hépatique, normalement dans le cas d'un surdosage de Mintezol^{MD}, et ceci provoquerait un stress oxydatif et une toxicité hépatique (Coulet et al., 2000; Horne et al, 2003; Dalvie et al., 2006; Figure 5.5). Toutefois, les mécanismes responsables de l'hépatotoxicité induite par ce médicament ne sont pas encore bien élucidés (Dalvie et al., 2006). Il se pourrait en fait que la 5-hydroxylation précoce et intense du thiabendazole compétitionne avec les voies métaboliques habituelles, d'où la formation de résidus liés aux protéines. Une corrélation significative a d'ailleurs été observée entre les taux de 5-hydroxylation et l'apparition de ces adduits (Coulet et al., 1998).

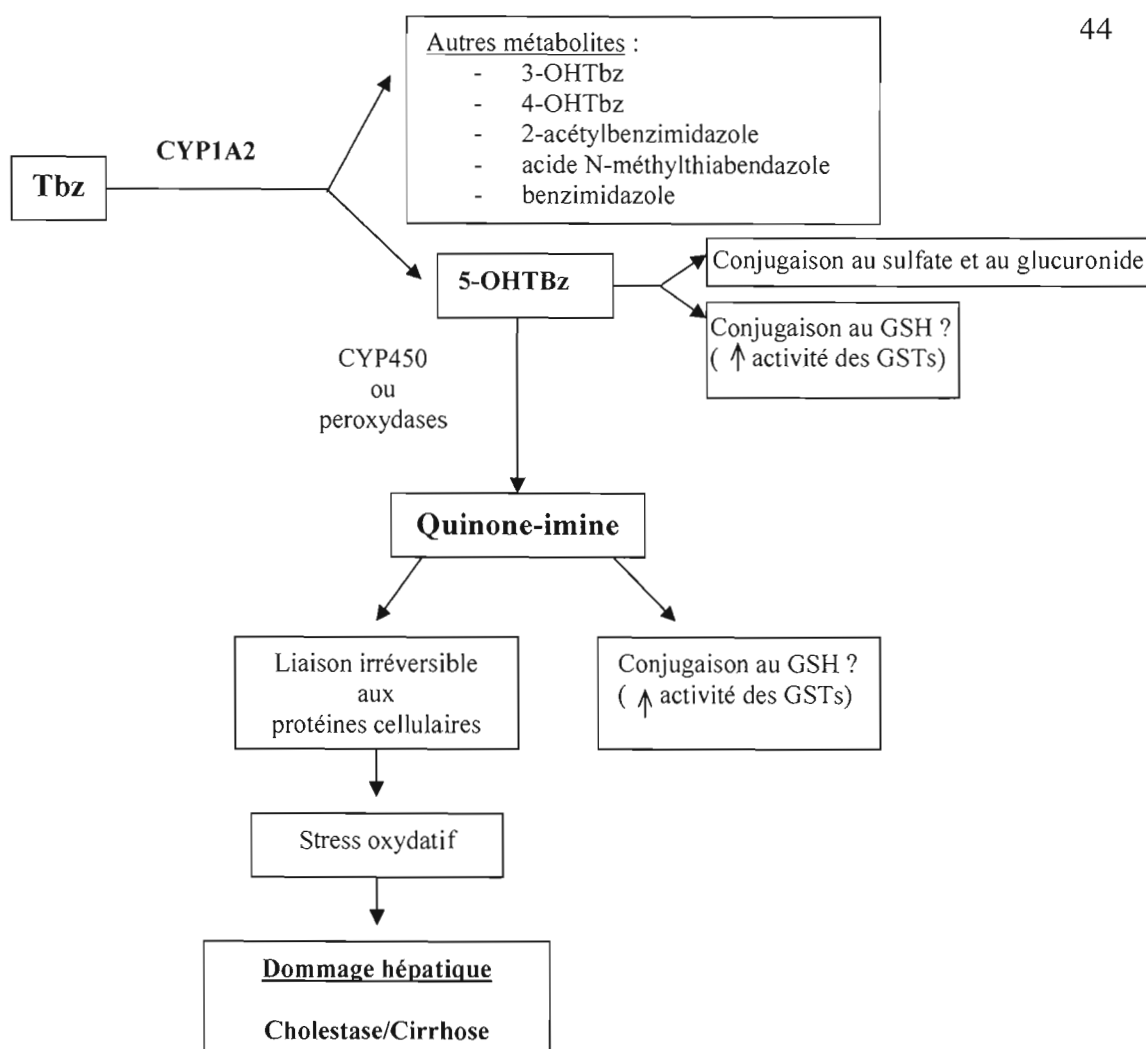


Figure 5.5 : Mécanisme d'hépatotoxicité du thiabendazole. Le principal métabolite est le 5-OHTbz, qui est ensuite biotransformé en un conjugué sulfate ou glucuronide éliminé dans la bile et l'urine; il se peut aussi que la conjugaison se fasse avec le GSH hépatique. De plus, d'autres métabolites sont formés (3-OHTbz, 4-OHTbz, 2-acétylbenzimidazole, acide N-méthylthiabendazole, benzimidazole). Également, le 5-OHTbz peut être converti en une quinone-imine via l'oxydation par le système du CYP450 ou les peroxydases. Cet intermédiaire réactif électrophile serait ensuite conjugué au GSH dans des conditions normales; cependant, en cas de surdosage de thiabendazole, la quinone-imine s'accumulerait et déprimerait le GSH. La molécule électrophile se lierait ensuite irréversiblement aux protéines cellulaires, avec pour conséquence un stress oxydatif et une hépatotoxicité se traduisant par une cholestase intra-hépatique pouvant dégénérer en une cirrhose micronodulaire. 3-OHTbz : 3-hydroxythiabendazole; 4-OHTbz : 4-hydroxythiabendazole; 5-OHTbz : 5-hydroxythiabendazole; GSH : glutathion ; GSTs : glutathion S-transférases (Références : Mizutani et al., 1990; Coulet et al., 1998; Toda et al., 2000; Price et al., 2005; Dalvie et al., 2006).

5.3 Posicor^{MD}

5.3.1 Généralités

Le Posicor^{MD} (Hoffman-La Roche, Inc., Basel, Suisse) (Figure 5.6) est un antagoniste du calcium développé pour le traitement de l'hypertension artérielle et de l'angine de poitrine chronique stable (Massie, 1998; Billups et Carter, 1998; Wandel et al., 2000). La dose maximale recommandée pour ce médicament est de 50 ou 100 mg une fois par jour (Massie, 1997; Kobrin et al., 1997; Billups et Carter, 1998). Son principe actif, le dichlorhydrate de mibéfradil (Ro 40-5967) est, tout comme le thiabendazole, un dérivé du benzimidazole (Skerjanec et Tam, 1995; Tzivoni et al., 1997). Le Posicor^{MD} est généralement bien supporté aux doses normales, mais il s'avère contre-indiqué entre autres en cas de maladies hépatiques (MedecineNet, 2005).

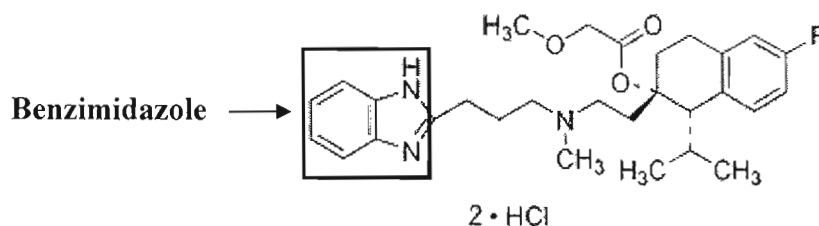


Figure 5.6: Formule structurale du dichlorhydrate de mibéfradil (Ro 40-5967). Le principe actif du Posicor^{MD} est un dérivé du benzimidazole comportant un groupement fluor et il appartient à la famille chimique des tétralines.

Le Posicor^{MD} a été retiré du marché en juin 1998, soit seulement 13 mois après son lancement, à cause d'interactions médicamenteuses sérieuses avec de nombreux médicaments (Tableau 3.1), parmi lesquels d'autres bloqueurs de canaux calciques et des bêta-bloquants. Le Posicor^{MD} inhibe en fait des enzymes hépatiques du métabolisme, ce qui mène à des complications cliniquement significative allant dans certains cas jusqu'à la mort (Food and Drug Administration, 1998; Wan Po et Zhang, 1998 ; Wandel et al., 2000). On soupçonne en fait que le Posicor^{MD} aurait causé au moins 143 décès, dont la plupart étaient dues à des arythmies cardiaques (Greek et Greek, 2002).

Tableau 5.1: Liste partielle des médicaments interagissant avec le Posicor^{MD}.

Nom générique	Nom commercial	Utilisation
amiodarone	Cordarone	Antiarythmique
astemizole	Hismanal	Antihistaminique
bepidil	Vesture	Traitement de l'angine de poitrine
cisapride	Propulsid	Traitement des brûlures d'estomac
cyclosporine	Neoral	Immunosuppresseur
cyclophosphamide	Cytosan	Agent chimiothérapeutique
desipramine	Norpramin	Anti-dépresseur
érythromycine	Érythroline	Traitement des infections bactériennes
etoposide	VePesid	Agent chimiothérapeutique
flecainide	Tambocor	Antiarythmique
flutamide	Eulexin	Antiandrogène
halofantrine	Halfan	Traitement du paludisme
ifosfamide	Ifex	Agent chimiothérapeutique
imipramine	Tofranil	Antidépresseur/analgésique
lovastatine	Mevacor	Hypocholestérolémiant
mexiletine	Mexitil	Antiarythmique
pimozide	Orap	Antipsychotique
propafenone	Rythmol	Antiarythmique
quinidine	Cardioquine	Antiarythmique
simvastatine	Zocor	Hypocholestérolémiant
tacrolimus	Prograf	Immunosuppresseur
tamoxifène	tamoxifène	Traitement du cancer du sein

De nombreux médicaments sont métabolisés par les mêmes enzymes hépatiques que le Posicor^{MD}, et leur utilisation en combinaison avec celui-ci peut s'avérer dangereuse (Food and Drug Administration, 1998).

5.3.2 Métabolisme

Le mibéfradil est métabolisé au niveau du foie par deux voies distinctes : l'hydrolyse de la chaîne latérale ester catalysée par les estérases, et l'oxydation catalysée par le CYP3A (CYP3A4 chez l'humain). Ce métabolisme donne lieu à une trentaine de métabolites (Wiltshire et al., 1997a). De façon générale, les métabolites sont éliminés dans l'urine (25%) ou la bile (75%) sous forme inactive, et moins de 3% du composé initial sont excrétés inchangés dans l'urine (Sandmann et Unger, 1999; du Souich et al., 2000). L'hydrolyse de la chaîne ester produit un métabolite alcool, le des-methoxyacétyl ((1S,2S)-2-[2-[[3-(2-Benzimidazolyl) propyl] methylamino] ethyl]-6-fluoro-1, 2,3,4-tetrahydro-1- isopropyl-2-naphthyl hydroxy hydrochloride) ou Ro 40-5966), qui exerce environ 10% de l'effet pharmacodynamique du mibéfradil inchangé (Wiltshire et al., 1997a; 1997b; Li et al., 2005). Ce métabolite peut lui-même être biotransformé par le CYP3A4, plus facilement d'ailleurs que le composé original, mais il produit moins de métabolites que celui-ci (Wiltshire et al., 1997a; Sandmann et Unger, 1999). Le métabolisme du mibefradil par le CYP3A4 se caractérise surtout par l'hydroxylation de l'atome de carbone benzylique du groupement tétrahydronaphtyl, et l'oxydation de l'alcool secondaire résultant en une cétone a également lieu. Ces réactions mènent aux principaux métabolites, les naphtyls glucuronides, formés par glucuronidation et excrétés dans la bile (Wiltshire et al., 1997a). La déalkylation du groupement amine tertiaire s'avère également importante et produit des composés exempts du groupement N-méthyl ou propylbenzimidazole (Wiltshire et al., 1997a). Il existe d'autres voies métaboliques majeures telles que la N-déméthylation et la perte du benzimidazole (Wiltshire et al., 1992). Aussi, l'hydroxylation de l'anneau benzimidazole aux positions 4 et 5 est largement restreinte au mibéfradil et n'a pas lieu de façon significative avec le métabolite alcool Ro 40-5966 (Wiltshire et al., 1997a).

5.3.3 Mécanisme d'hépatotoxicité

La toxicité induite par les interactions médicamenteuses avec d'autres composés pharmacologiques s'avère bien documentée, mais le mécanisme d'hépatotoxicité direct du

Posicor^{MD} n'a pas vraiment été étudié. Cependant, cette toxicité devrait avoir lieu selon le même principe général que pour l'acétaminophène et le thiabendazole, c'est-à-dire qu'elle serait provoquée par l'accumulation de métabolites hautement réactifs issus de la biotransformation du composé original et déplaçant les réserves intrahépatiques de glutathion, ce qui mènerait à la formation d'adduits avec les protéines, à un stress oxydatif et à des dommages hépatiques (mort des cellules) (Meeks et al., 1991; Berry et Edwards, 2000; Park et al., 2005).

CHAPITRE VI

MODÈLE D'ÉTUDE

6.1 Modèle d'étude *in vitro*

En laboratoire, l'évaluation du métabolisme et des propriétés toxicologiques des agents chimiques à l'aide de cellules ou de tissus isolés est un domaine ayant rapidement évolué depuis les années 1990 (Berry et Edwards, 2000). Le choix du modèle *in vitro* dans le cadre de cette étude s'explique en fait par des avantages importants qui le caractérisent par rapport au modèle *in vivo*. Ainsi, en particulier, les études *in vitro* permettent de procéder à plusieurs types de tests à partir d'un seul animal. On peut exposer les cellules isolées de l'animal à des concentrations différentes de plusieurs médicaments, et effectuer plusieurs types d'analyses à la fois. Ceci permet donc de limiter le nombre d'animaux utilisés en laboratoire, d'économiser du temps, et de minimiser le coût des expériences (Rauckman et Padilla, 1987; Berry et Edwards, 2000). Aussi, un avantage majeur de l'utilisation de cellules isolées pour les études toxicologiques réside dans le fait que les concentrations de l'agent toxique, de même que les conditions dans lesquelles il est employé, peuvent être étroitement contrôlées dans un environnement semblable à celui retrouvé *in vivo*, sans les restrictions causées par l'emploi de substances toxiques chez un animal intact (Rauckman et Padilla, 1987).

6.2 Choix des hépatocytes de rats

Les hépatocytes constituent le centre du métabolisme des xénobiotiques, et s'avèrent la première et la principale cible des composés toxiques (Meeks et al., 1991; Berry et Edwards, 2000). De fait, les cultures primaires d'hépatocytes représentent un modèle *in vitro* établi et idéal pour évaluer l'hépatotoxicité des médicaments de même que leur métabolisme par les isoformes du CYP450, entre autres (Bader et al., 2004; Shen et al., 2006; Henkens et al., 2007). De plus, le choix d'utiliser spécifiquement des hépatocytes de rat s'explique par le

rendement important pouvant être obtenu à partir de l'isolation des cellules d'un seul animal.

6.3 Méthode d'isolation des hépatocytes

L'utilisation des hépatocytes en tant que système cellulaire pour les études *in vitro* a été rendue possible par le développement et la disponibilité de méthodes permettant d'isoler et de maintenir intactes et fonctionnelles les cellules hépatiques (Rauckman et Padilla, 1987). Les premières méthodes employaient simplement l'hyaluronidase et la digestion par la collagénase (Howard et Pesch, 1968; Berry et Friend, 1969), mais on a ensuite découvert que la perfusion du foie en premier lieu à l'aide d'un agent chélatant puis avec la collagénase représentait une méthode hautement efficace pour la dissociation (Seglen, 1972). Cette perfusion du foie en deux étapes est présentement la technique la plus couramment employée pour la préparation de cultures primaires d'hépatocytes à partir de nombreuses espèces, parmi lesquelles le rat (Reese et Byard, 1981; Maslansky et Williams, 1982).

6.4 Avantages des cultures primaires

Différents modèles peuvent être utilisés pour mesurer *in vitro* le métabolisme et la toxicité chimique, soit principalement l'emploi de lignées cellulaires de mammifères, de systèmes d'organes perfusés, de tranches de tissus hépatiques et de cultures primaires d'hépatocytes. Cependant, parmi toutes ces approches, les cultures primaires représentent le modèle le plus avantageux (Rauckman et Padilla, 1987).

D'une part, le fait de travailler avec des cultures primaires d'hépatocytes pour les études métaboliques et d'hépatotoxicité des médicaments apporte plusieurs avantages par rapport aux lignées cellulaires (Rauckman et Padilla, 1987). En effet, ces dernières s'avérant transformées, il y a donc insertion d'oncogènes, ce qui modifie le génotype; ceci risque fortement de fausser toute mesure de cytotoxicité effectuée sur ces cellules, puisque leurs réponses toxicologiques aux médicaments se trouvent très éloignées de la situation *in vivo* (Rauckman et Padilla, 1987; Jaeschke, 2005). Également, malgré le fait que les lignées cellulaires se maintiennent plus facilement que les cultures primaires, elles retiennent

habituellement peu de caractéristiques fonctionnelles des hépatocytes; elles ne peuvent donc pas activer métaboliquement une quantité significative de médicament et ne miment pas adéquatement les conditions *in vivo* pour les études d'hépatotoxicité (Rauckman et Padilla, 1987; Jaeschke, 2005; Jaeschke et Bajt, 2006). Au contraire, les cultures primaires conservent toutes les capacités métaboliques des hépatocytes, puisqu'elles préservent l'activité des enzymes exprimées dans le foie intact, parmi lesquelles celles du métabolisme de phase I et II (Rauckman et Padilla, 1987). De fait, les résultats obtenus avec des cellules de cultures primaires non transformées peuvent être considérés plus fiables pour la prédiction des effets anticipés *in vivo* (Rauckman et Padilla, 1987). De plus, les cultures primaires d'hépatocytes représentent un meilleur système pour évaluer l'hépatotoxicité et le métabolisme des médicaments, non seulement parce que les cellules isolées se montrent capables d'inactiver ou d'activer ceux-ci en espèces réactives, mais aussi parce que les cellules elles-mêmes peuvent être des cibles de la toxicité et fournir une mesure de l'effet en question (Schmeltz et al., 1978; Rauckman et Padilla, 1987).

Néanmoins, il demeure que certains gènes s'avèrent surexprimés (ex. : «multidrug resistance associated protein transporter 3» [mrp3]); «multidrug resistance 1b» [mdr1b]) ou sous-exprimés (ex. : CYP2B1/2; CYP3A4; CYP2C11) avec l'augmentation de l'âge des cultures primaires (Luttringer et al., 2002; Boess et al., 2003).

Enfin, on pourrait penser que les tranches de tissus ou les systèmes d'organes perfusés peuvent également constituer des modèles expérimentaux intéressants pour l'évaluation *in vitro* de la toxicité et du métabolisme, puisque la structure des cellules demeure pratiquement inchangée. Cependant, ces méthodes de préparation se caractérisent par d'importants désavantages (Rauckman et Padilla, 1987). Ainsi, une diffusion inadéquate de l'oxygène de même qu'une mauvaise diffusion du substrat, avec une nécrose résultante, font partie des problèmes rencontrés avec les tranches de foie, et mènent à une viabilité plus faible (Smith et al., 1977). Quant au foie perfusé, il possède une période de viabilité relativement courte, et il s'agit d'une méthode coûteuse et techniquement complexe par rapport aux autres types de préparation, sans compter les problèmes de reproductibilité rencontrés (Smith et al., 1977).

6.5 Film de collagène

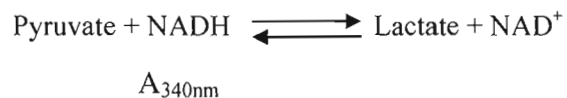
La matrice extracellulaire du foie est constituée de plusieurs protéines nécessaires aux interactions cellules-matrice, parmi lesquelles le collagène (Xu et al., 1992; Lodish et al., 1997). De fait, l'ajout d'un film de collagène au fond des pétris dans lesquels sont cultivées les cellules parenchymateuses permet de favoriser leur ancrage et ainsi de minimiser la mortalité (Berman, 1980; Bader et al., 2004; Dehili et al., 2006). Ce type de support en monocouche s'avère d'ailleurs employé dans la plupart des cultures primaires traditionnelles d'hépatocytes (Zurlo et Arterburn, 1996; Bader et al., 2004). Toutefois, il ne favorise pas le maintien de la morphologie hépatocytaire mais entraîne plutôt l'étalement de ces cellules sur la surface de la matrice bidimensionnelle et leur dédifférenciation, d'où la perte de leur fonctionnalité spécifique; celle-ci se traduit par la diminution du niveau de plusieurs enzymes (ex. : cytochromes P450, albumine) (Dunn et al., 1989; Yagi et al., 1997; Bader et al., 2004). De fait, il ne s'agit pas d'un modèle idéal pour des cultures à long terme (Dunn et al., 1989); néanmoins, il demeure intéressant dans le cas d'une expérimentation à plus ou moins court terme, comme dans le cas de notre étude, pour laquelle les temps d'incubation ne dépassent pas 48 heures.

CHAPITRE VII

MÉTHODES D'ÉTUDE DES MÉDICAMENTS SUR LES CULTURES PRIMAIRES D'HÉPATOCYTES

7.1 Viabilité : libération de la lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique présente en grande quantité dans les hépatocytes, et libérée suite à la formation de pores au niveau de la membrane après une attaque cytotoxique (Moldeus, 1978; Rauckman et Padilla, 1987; Meeks et al., 1991). Ainsi, la mesure de l'activité de la LDH libérée dans le milieu extracellulaire des cultures primaires d'hépatocytes peut permettre d'évaluer l'intégrité de la membrane plasmique des hépatocytes, donc de fournir des indices quant à la viabilité cellulaire. Cette enzyme catalyse en fait l'oxydation réversible du pyruvate en lactate, une étape clef du métabolisme énergétique de la plupart des cellules (Meeks et al., 1991). Simultanément, le NADH se trouve oxydé en NAD^+ dans la réaction d'oxydo-réduction suivante :



Étant donné que le NADH absorbe fortement à 340 nm contrairement au NAD^+ , la LDH est dosée dans le milieu extracellulaire en suivant la diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde (Moldeus, 1978).

7.2 Fonction hépatospécifique : sécrétion d'albumine

L'albumine représente un marqueur biologique sensible pour l'étude de la capacité de synthèse et de sécrétion hépatique, puisqu'elle est produite exclusivement par les hépatocytes (Thomson et Shaffer, 2000). Son dosage peut permettre d'évaluer en partie la perte ou non des fonctions hépatiques suite à l'exposition d'hépatocytes à des substances potentiellement toxiques, donc de mesurer l'atteinte hépatocellulaire.

De façon pratique, le dosage de l'albumine est réalisé par la technique du «enzyme-linked immunosorbent assay» (test ELISA) de type «sandwich», selon le principe suivant : les puits d'une microplaque sont tapissés avec un anticorps anti-albumine de rat (dans le cas du dosage de l'albumine de rat), qui se fixe au plastique des puits. Ceci va permettre la capture spécifique de l'albumine présente dans le milieu de culture testé. Ensuite, l'albumine de rat est révélée par l'ajout d'un traceur, à savoir, un anticorps dirigé contre cette protéine et conjugué à la peroxydase. La réaction, catalysée par l'enzyme, du H_2O_2 avec l'o-phénylènediamine (OPND) produit un dérivé coloré dont la concentration s'avère proportionnelle à celle de l'albumine présente dans le milieu. L'absorbance pour chaque puits est finalement mesurée à une longueur d'onde de 492 nm, au moyen d'un lecteur de microplaque (Uotila et al., 1981).

7.3 Métabolisme hépatique : mesure de l'activité des isoformes du CYP450

Des études *in vitro* effectuées sur des cultures primaires d'hépatocytes permettent de déterminer la modulation de l'activité d'isoenzymes du CYP450 par des composés donnés au niveau de ces cellules. Des sondes fluorescentes métabolisées par les CYP450s peuvent être utilisées afin de mesurer l'activité de O-désalkylation de certaines isoenzymes (Burk et al., 1985); ces sondes sont souvent des dérivés du résorufin. L'emploi de marqueurs associés spécifiquement aux diverses isoformes du CYP450 s'avère privilégié pour préciser le comportement enzymatique; par exemple, le 7-éthoxyrésorufin et le 7-pentoxyrésorufin sont désalkylés particulièrement par le CYP1A1/1A2 et le CYP2B1/2B2, respectivement (Burk et al., 1985).

7.4 Évaluation de l'apoptose et de la nécrose

Lors de l'étude de l'effet d'un médicament sur des hépatocytes, il s'avère utile de pouvoir distinguer les cellules mortes par apoptose de celles mortes par nécrose. Pour cela, il est possible d'exposer les hépatocytes à la fois à une molécule fluorescente permettant d'évaluer l'apoptose (ex. : Hoechst 33258) et à un fluorochrome identifiant les cellules en nécrose (iodure de propidium ou PI) (Haugland, 2002).

7.4.1 Test de Hoechst

La molécule Hoechst 33258 (H33258) est une sonde fluorescente réagissant spécifiquement avec l'ADN, au niveau de l'adénine et de la thymine, par intercalation (Drobyshev et al., 1999; Haugland, 2002). Elle fournit ainsi un outil pour l'étude de la fragmentation de l'ADN (condensation de la chromatine), et permet de distinguer les cellules en apoptose et les cellules vivantes de celles en nécrose (Ioannou et Chen, 1999). En fait, le Hoechst 33258 possède la particularité d'être exclu des cellules nécrotiques, mais pas des cellules apoptotiques ou vivantes. L'intensité de fluorescence observée par microscopie se montre proportionnelle au niveau de condensation de la chromatine, une des caractéristiques de l'apoptose (Haugland, 2002).

7.4.2 Iodure de propidium

Le PI est un fluorochrome de l'ADN, qui s'intercale entre les bases avec très peu de préférence. L'ajout de PI à des cellules en culture permet de discriminer entre les cellules nécrotiques (et en fin d'apoptose) et les autres. En effet, cette sonde pénètre passivement dans la membrane et s'avère relarguée activement par les cellules en début d'apoptose et les cellules vivantes, mais n'est pas exclue des cellules nécrotiques et en fin d'apoptose (Haugland, 2002).

7.4.3 Mesure de l'activité des caspases

L'évaluation de l'activité de certaines caspases jouant des rôles clefs dans les voies d'activation apoptotiques, par exemple, les caspases-3, -8 et -9, peut permettre d'une part de vérifier si une substance donnée induit ou non l'apoptose dans certaines conditions et, d'autre part, de spéculer quant aux voies apoptotiques qui seraient activées. Cette mesure peut s'effectuer entre autres par l'évaluation fluorimétrique de la cinétique du clivage protéolytique de substrats fluorogènes synthétiques assez spécifiques à chaque caspase (Boulares et al., 2002; Gujral et al., 2002).

7.5 Mesure du potentiel membranaire mitochondrial

La mesure du potentiel membranaire permet d'évaluer l'induction de la voie apoptotique mitochondriale dans des cellules par une substance toxique. Plusieurs cations lipophiles perméables aux membranes peuvent s'accumuler dans les mitochondries des cellules eucaryotes en réponse au potentiel électrique membranaire mitochondrial (Chen, 1988; Baracca et al., 2003), et sont donc couramment employés pour étudier celui-ci (Johnson et al., 1981). Parmi ces sondes, on retrouve la Rhodamine 123 (RH-123), qui présente une activité de fluorescence suite à sa distribution dans des systèmes énergisés (Davey et al., 1993; Baracca et al., 2003); le taux de diminution de cette fluorescence s'avère proportionnel au potentiel membranaire mitochondrial (Baracca et al., 2003). La mesure de ce potentiel à l'aide de la RH-123 peut être effectuée en conjonction avec la technique de cytométrie en flux (Davey et al., 1993; Baracca et al., 2003), par l'évaluation des changements dans l'intensité de fluorescence des cellules colorées avec ce marqueur (Ronot et al., 1986; Baracca et al., 2003). De plus, l'utilisation de la RH-123 en association avec le PI permet de distinguer les cellules mortes des vivantes; ainsi, le cytomètre mesure le potentiel membranaire mitochondrial uniquement au sein de la population viable (Cossarizza et al., 1994).

7.6 Évaluation de l'expression protéique

L'évaluation de l'expression des protéines impliqués dans les voies de signalisation apoptotique peut permettre de confirmer ou d'infirmer l'induction d'une ou des deux voies principales dans les cellules hépatocytaires suite à l'exposition de celles-ci à une substance donnée dans des conditions bien déterminées. Il est possible pour cela d'employer la technique de l'immunobuvardage de type Western (Tinel et al., 2004), après avoir procédé à des fractionnements subcellulaires par ultracentrifugation ayant pour but la récupération des fractions (ex. : mitochondriale, cytosolique) dans lesquelles on désire détecter les protéines d'intérêt (Tinel et al., 2004). Ces fractionnements mettent en jeu, dans un premier temps, l'homogénéisation de préférence manuelle des cellules, puis une série de centrifugations effectuées à des vitesses, des temps et des températures bien précises (Reader et al., 1999).

CHAPITRE VIII

PRÉSENTATION DU PROJET

8.1 Problématique et objectifs de la recherche

La plupart des médicaments utilisés chez l'humain peuvent exercer des effets hépatotoxiques qui peuvent être évalués en système de culture cellulaire. L'hépatotoxicité induite par les médicaments s'avère en fait un problème majeur de santé publique et représente dans les pays développés la première cause d'insuffisance hépatique aiguë, laquelle se caractérise par une incidence de mortalité pouvant atteindre 95% (Fingerote et Bain, 1993 ; Caraceni et Van Thiel, 1995 ; Keeffe, 2005). Les hépatocytes constituent le principal lieu du métabolisme des xénobiotiques par le système enzymatique du cytochrome P450, ce qui les rend particulièrement vulnérables aux lésions d'origine médicamenteuse (Meeks et al., 1991; Berry et Edwards, 2000). De fait, les cultures primaires d'hépatocytes constituent un modèle *in vitro* établi et idéal pour l'évaluation de l'hépatotoxicité et du métabolisme des médicaments (Berry et Edwards, 2000; Bader et al., 2004; Shen et al., 2006).

L'antiparasitaire antihelminthique thiabendazole est généralement considéré comme sécuritaire, bien que des choléstases intrahépatiques sévères progressant souvent vers des cirrhoses (Roy et al., 1989; Mohi-ud-din et Lewis, 2004; Dalvie et al., 2006) ont été rapportées suite à la prise de ce médicament. Toutefois, mis à part des mesures de viabilité cellulaire attribuant au thiabendazole très peu d'hépatotoxicité (Aix et al., 1994 ; Baliharova et al., 2003 ; Lemaire et al., 2004), aucune étude n'a été publiée qui se soit vraiment penchée sur l'effet de ce composé sur le métabolisme hépatique et sur les mécanismes moléculaires de la mort cellulaire induite par le thiabendazole.

Le mibefradil était utilisé contre l'hypertension et l'angine de poitrine. Bien que ses interactions avec plusieurs médicaments eux aussi métabolisés par l'isoenzyme CYP3A du CYP450 et/ou par la P-glycoprotéine aient été largement étudiées (Prueksaritanont et al.,

1999; Wandel et al., 2000), le mode de mort cellulaire provoqué par le mibéfradil et les mécanismes de son hépatotoxicité directe demeurent également pratiquement inconnus.

Enfin, l'analgésique et antipyrétique acétaminophène (APAP) se montre normalement sécuritaire lorsque ingéré aux doses thérapeutiques; cependant, un surdosage représente un risque important de dommages au foie (Plaa et Hewitt, 1998; Park et al., 2005; Latchoumycandane et al., 2007). Ce médicament a été très bien caractérisé, mais le type de mort cellulaire, soit l'apoptose ou la nécrose, induit par les surdoses d'APAP a été mis en question récemment (Fiorucci et al., 2004; Macanas-Pirard et al., 2005; Kon et al., 2007).

Il est important de comprendre les mécanismes de toxicité des médicaments et leur effet sur l'activité des CYP450s, afin d'éviter ou de minimiser les problèmes de toxicité aux organes clefs comme le foie et d'éviter la toxicité engendrée par les interactions entre médicaments. Ceci permet de plus de trouver des moyens de détoxification lors de surdoses médicamenteuses.

Pour notre étude, nous sommes partis de l'hypothèse que, comme l'APAP, le mibéfradil et le thiabendazole pourraient engendrer l'hépatotoxicité, qui sera traduite par des changements du métabolisme hépatique et l'induction de la mort cellulaire par apoptose et/ou nécrose.

Le but général est donc d'évaluer le métabolisme, le mécanisme d'hépatotoxicité et le type de mort cellulaire induit par le thiabendazole et le mibefradil, en prenant pour modèle des cultures primaires d'hépatocytes de rat sur film de collagène, et en se servant de l'APAP comme composé de référence puisqu'il s'avère bien caractérisé et que les mécanismes d'hépatotoxicité qu'il induit sont connus.

Afin de réaliser cette étude, nous avons établi les objectifs spécifiques suivants pour chaque médicament :

- 1- Déterminer l'hépatotoxicité.

- 2- Évaluer la fonction métabolique des hépatocytes.
- 3- Évaluer la modulation de l'activité de certaines isoformes du cytochrome P450 (CYP1A1/2 et CYP2B1/2).
- 4- Déterminer le ou les type(s) de mort cellulaire (i.e. : apoptose et/ou nécrose) induit(s).
- 5- Vérifier l'activation des deux principales voies de l'apoptose.

L'hépatotoxicité sera déterminée par la mesure de la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) puis au moyen d'observations morphologiques par microscopie optique. Par ailleurs, la fonction métabolique hépatocytaire sera évaluée par la quantification de la synthèse d'albumine par les hépatocytes, et l'effet des médicaments sur l'activité du CYP1A1/2 et du CYP2B1/2 le sera par la mesure de l'activité du 7-éthoxyresorufin-O-deéthylase (EROD) et du 7-pentoxyresorufin-O-dealkylase (PROD), respectivement. Le type de mort cellulaire induit sera ensuite déterminé à l'aide de la sonde Hoechst 33258 (apoptose) et de l'iodure de propidium (nécrose), par microscopie en fluorescence. Enfin, l'activation des deux principales voies de l'apoptose sera vérifiée. D'une part, pour la voie des récepteurs de mort, elle le sera par la mesure de l'activation de la caspase-8 initiatrice et par l'observation de la translocation de la protéine adaptatrice «Fas-associated death domain» (FADD) du cytosol aux membranes. D'autre part, l'induction de la voie mitochondriale sera déterminée par la mesure de la chute du potentiel membranaire mitochondrial, l'observation de la libération du cytochrome c dans le cytosol, et l'évaluation de l'activité de la caspase-9 initiatrice. Finalement, l'activation de la caspase-3 effectrice, point de convergence des deux principales voies apoptotiques, sera mesurée.

L'intérêt majeur des résultats de cette recherche est qu'il s'agira, à notre connaissance, de la première étude mesurant l'hépatotoxicité du mibéfradil et l'effet de ce

médicament ainsi que celui du thiabendazole sur le niveau de synthèse d'albumine par les hépatocytes. De plus, elle fournira pour la première fois une évaluation du mode et du mécanisme de mort cellulaire induit pour chacun de ces deux composés. La connaissance du mécanisme de toxicité du thiabendazole permettra d'investiguer les manières de diminuer cette hépatotoxicité. Dans le cas du mibéfradil, puisqu'il est retiré du marché, l'élucidation de son mécanisme de toxicité permettra plutôt de diriger la recherche sur le développement de médicaments similaires démontrant moins de toxicité.

DEUXIÈME PARTIE : PARTIE EXPÉRIMENTALE

PRÉFACE

Les chapitres suivants comprennent deux manuscrits sous forme d'articles, intitulés «Mechanism of toxicity of the calcium channel blocker PosicorTM in primary cultures of rat hepatocytes», et «Induction of cytotoxicity by the fungicide MintezolTM in primary cultures of rat hepatocytes».

Le premier manuscrit sera soumis sous peu pour publication au périodique *Toxicology and Applied Pharmacology*, et porte sur l'étude du mécanisme de toxicité du Posicor^{MD} en culture primaire d'hépatocytes.

Le second manuscrit sera soumis pour publication au *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Il porte sur l'étude de l'induction de la cytotoxicité par le Mintezol^{MD} en culture primaire d'hépatocytes.

Ces manuscrits ont été rédigés par moi-même, Marilynne Séide, et révisés par ma directrice, le Dr. Diana Averill-Bates. Mon co-directeur, le Dr. Mircea Alexandru Mateescu, a participé à l'encadrement de mes études de maîtrise et à la révision des deux articles.

L'ensemble des expériences présentées dans ces manuscrits ont été effectuées par moi-même. Michel Marion a toutefois effectué les chirurgies de rats pour l'isolation des hépatocytes, et m'a apporté son aide dans certaines techniques.

CHAPITRE IX

ARTICLES

9.1 Mécanisme de toxicité du bloqueur de canaux calciques Posicor^{MD} en culture primaire d'hépatocytes

Marilyne Séide¹, Michel Marion¹, Mircea Alexandru Mateescu¹ et Diana A. Averill-Bates^{2*}.

¹Département de chimie

²Département des sciences biologiques

Université du Québec à Montréal. C.P. 8888, Succursale Centre Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

*Auteur de correspondance

Plusieurs médicaments utilisés chez l'humain peuvent exercer des effets hépatotoxiques, ce qui peut mener à de graves maladies hépatiques telles que l'insuffisance hépatique aiguë. Cette étude évalue la toxicité du bloqueur de canaux calciques Posicor^{MD} (mibéfradil), autrefois utilisé dans le traitement de l'hypertension et de l'angine de poitrine, en culture primaire d'hépatocytes de rats. Nous avons évalué l'hépatotoxicité de ce composé, de même que le mode et le mécanisme de mort cellulaire qu'il induit. Le médicament Tylénol^{MD} (acétaminophène), bien caractérisé, a été employé en tant que composé de référence. Le mibéfradil (5-20 μ M, 24 and 48 h) a causé des changements morphologiques (tels qu'observés par microscopie optique) et a diminué la viabilité (déterminée par la libération de la lactate déshydrogénase) et le métabolisme (évalué par la sécrétion d'albumine) des hépatocytes. Il y a eu une augmentation de la nécrose avec le mibéfradil, détectée à l'aide de l'iodure de propidium. De plus, le mibéfradil (5-20 μ M, 24 and 48 h) a augmenté l'activité du CYP2B, mais n'a pas eu d'effet sur celle du CYP1A (tel que déterminé par la mesure 7-pentoxyrésorufin-O-déalkylase (PROD) et du 7-éthoxyrésorufin-O-déalkylase (EROD), respectivement). Par ailleurs, le mibéfradil (5 μ M) a induit la mort cellulaire par apoptose dans les hépatocytes de rat par la voie des récepteurs de mort (12 h) et la voie mitochondriale (3 h). Cette induction s'est manifestée par l'activation des caspases-3, -8 et -9, la chute du potentiel membranaire mitochondrial, la libération du cytochrome c dans le cytosol et la translocation de la protéine «Fas-associated death domain» du cytosol aux membranes. Ces résultats montrent que le mibéfradil est plus hépatotoxique, sur une base molaire, que le médicament bien caractérisé acétaminophène. De plus, ils améliorent notre compréhension des mécanismes de toxicité du mibéfradil, ce qui pourrait se montrer utile pour diriger la recherche sur le développement de médicaments similaires démontrant moins d'hépatotoxicité.

Sera soumis à : *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*

9.2 MECHANISM OF TOXICITY OF THE CALCIUM CHANNEL BLOCKER POSICORTM IN PRIMARY CULTURES OF RAT HEPATOCYTES

Marilyne A. Séide^{1,2}, Michel Marion¹, Mircea Alexandru Mateescu¹ and Diana A. Averill-Bates^{2*}

¹Département de chimie, ²Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal

* Corresponding author:

Diana Averill: averill.diana@uqam.ca

Phone number: (514) 987-3000 (ext. 4811), fax: (514) 987-4647

Université du Québec à Montréal

Département des sciences biologiques

C.P.8888, succ Centre Ville

Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Keywords : mibefradil; acetaminophen; apoptosis; necrosis; hepatocytes; hepatotoxicity; caspases; albumin.

Abbreviations : APAP, N-acetyl-para-aminophenol; H-33258, Hoechst 33258; PI, propidium iodide; CYP, cytochrome P450; EROD, ethoxyresorufin-o-deethylase; PROD, pentoxyresorufin-o-dealkylase; FADD, Fas-associated death domain; NAPQI, N-acetyl-para-benzoquinone-imine; P-gp, P-glycoprotein; LDH, lactate dehydrogenase; Rh-123, rhodamine 123; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; FCCP, carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; MTT, methyl tetrazolium; TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling.

9.2.1 Abstract

Many drugs used in human medicine exhibit hepatotoxicity, which can lead to serious diseases such as acute liver failure. This study evaluates the toxicity of the calcium channel blocker PosicorTM (mibefradil), which has been used in the treatment of hypertension and angina pectoris, in primary cultures of rat hepatocytes. We investigated the hepatotoxicity of this compound as well as its mode and mechanism of cell death. The well-characterized hepatotoxic drug TylenolTM (acetaminophen) was used as a reference compound. Mibefradil (5-20 μ M, 24 and 48 h) caused morphological changes (as observed by optical microscopy) and decreased the viability (assessed by leakage of lactate dehydrogenase) and metabolism (evaluated by albumin secretion) of hepatocytes. There was an increase in necrosis with mibefradil, detected using propidium iodide. Furthermore, exposure to mibefradil (5-20 μ M) for 24 and 48 h increased CYP2B activity, but had no effect on CYP1A activity (as determined by the measurement of 7-pentoxoresorufin-O-dealkylase (PROD) and 7-ethoxoresorufin-O-deethylase (EROD) activities, respectively). In addition, mibefradil (5 μ M) caused cell death in rat hepatocytes by apoptosis, assessed by chromatin condensation, through both the death receptor (12 h) and mitochondrial (3 h) pathways. This was manifested through activation of caspases -3, -8 and -9, collapse of mitochondrial membrane potential, liberation of cytochrome c into the cytosol and translocation of the «Fas-associated death domain» protein from the cytosol to membranes. These results demonstrate that mibefradil is more hepatotoxic on a molar basis than the well-characterized drug acetaminophen. These findings improve our understanding of the mechanism of toxicity of mibefradil, which could be useful for developing similar drugs exhibiting less hepatotoxicity.

9.2.2 Introduction

Hepatocytes are the major site of xenobiotic metabolism, principally by the cytochrome P450 (CYP450) isoenzymes, and are thereby the first and main targets of chemical compounds (Meeks et al., 1991; Lichtman et al., 2006). The CYP450s usually transform liposoluble and toxic xenobiotics into non-toxic and more hydrosoluble products that are easily eliminated from the organism (Meeks et al., 1991). Moreover, hepatocytes exert many hepatospecific functions, including the synthesis of albumin, which is the most abundant protein of the blood system (Carter and Ho, 1994). Thus, primary cultures of hepatocytes represent an ideal and well established *in vitro* model to evaluate the hepatotoxicity of xenobiotics, such as drugs and environmental toxins, and their metabolism by the CYP450 isoforms (Bader et al., 2004; Shen et al., 2006).

Many pharmaceutical drugs can exhibit hepatotoxicity in humans, leading to serious diseases, including acute liver failure, which has a mortality of up to 95% of all affected patients (Fingerote and Bain, 1993; Caraceni and Van Thiel, 1995). Hepatotoxicity can originate from several types of cell death, including apoptosis and necrosis. Apoptosis is an active and highly controlled physiological process observed in most living cells (Huerta et al., 2007; Wang et al., 2005). It involves the activation of a complex internal machinery that is finely regulated by genes or the intracellular proteins by which these are expressed (Yin et Dong, 2003). The activation of the cysteine aspartate-specific proteases termed as caspases plays a central role in apoptosis, being involved in its initiation and its execution (Mirkes, 2002; Yin and Dong, 2003). The caspases are responsible for the many cellular, morphological and biochemical changes that characterize apoptosis (Jaeshke et al., 2004; Wang et al., 2005). These changes include cell shrinkage, phosphatidyl serine externalization, chromatin condensation and margination in the nucleus and the formation of membrane-bound vesicles called apoptotic bodies (Zornig et al., 2001; Jaeshke et al., 2004). However, the membrane remains intact and the apoptotic bodies are rapidly phagocytosed by macrophages or neighboring cells with the consequence that no inflammation occurs in surrounding tissues (Wang et al., 2005; Shattenberg et al., 2006).

Apoptosis may be activated by several molecular pathways, the best characterized being the extrinsic and intrinsic pathways (Kroemer et al., 2007). In the extrinsic pathway or death receptor pathway, apoptosis is initiated by the activation of death receptors (ex.: CD95/Fas) at the cell surface and involves adaptor proteins such as Fas-associated death domain (FADD) that translocate from the cytosol to the cell membrane (Kroemer et al., 2007; Huerta et al., 2007). In the intrinsic or mitochondrial pathway, apoptosis involves the release of cytochrome c from the mitochondrial intermembrane space into the cytosol (Wang et al., 2005; Kroemer et al., 2007; Huerta et al., 2007).

Necrosis is a random and disorganized process, usually occurring after cells have undergone a major insult that has caused irreparable damage (Krauss, 2001). Necrosis involves cell swelling, vacuolisation, karyolysis (dissociation of the nucleus) and release of cellular contents, which can cause inflammatory damage to neighboring cells and tissues (Kam and Ferch, 2000; Jaeschke et al., 2004; Kroemer et al., 2007).

Mibefradil is a calcium antagonist used to treat hypertension and stable angina pectoris (Billups et Carter, 1998; Wandel et al., 2000; Price et al., 2004). Mibefradil is generally well tolerated at normal doses of 50 or 100 mg (18.71 or 37.42 μ M, considering that the average volume of blood in an adult is 4.7 L) per day (Massie et al., 1997; 1998; Kobrin et al., 1997; Oleksy, 2001). Moreover, in clinical studies with mild-to-moderate hypertensive patients (Bernik et al., 1996; Oparil et al., 1997; Wiltshire et al., 1997) and healthy volunteers (Welker et al., 1998b), mean plasma concentrations of mibefradil ranged from 193 ± 122.7 ng/ml to 302 ± 143 ng/ml and 438 ± 177 ng/ml to 910 ng/ml, after 28 days of once-daily oral administration of 50 mg and 100 mg of the drug, respectively. Furthermore, when single doses of mibefradil 50 mg or 100 mg were administered orally to healthy volunteers and/or patients with hepatic impairment or renal failure, peak plasma concentrations ranged from 248 ± 47.5 ng/ml (at 1.7 ± 0.6 h) to 375 ng/ml (at 2 h) and from 150 ng/ml (at 3 h) to 500 ng/ml (at 6 h), respectively (Welker et al., 1998a; 1998b). However, mibefradil was removed from the market in June 1998 only 13 months following its launch, due to interactions with more than 25 drugs, including other calcium channel blockers and

beta blockers (Wan Po et Zhang, 1998; Wandel et al., 2000; Food and Drug Administration, 2002). Mibefradil is metabolized by the human isoenzyme CYP3A, esterase-catalyzed hydrolysis (Ortiz de Montellano, 1995; Wiltshire et al., 1997) and by P-glycoprotein (P-gp) (Ernst et Kelly, 1998; Wandel et al., 2000; Bennett et al., 2000). It can inhibit its own metabolism by diminishing the activities of both CYP3A and P-gp (Wandel et al., 2000). Also, mibefradil inhibits the isoenzymes CYP2D6 and CYP2C9 (Ma et al., 2000). Inhibition of these enzymes leads to increases in plasma concentrations of other drugs metabolized by these CYP450 isoforms and/or by P-gp, ultimately causing toxicity and potentially fatal adverse reactions (Prueksaritanont et al., 1999; Wandel et al., 2000). Although the interactions of mibefradil with other drugs have been largely studied (Prueksaritanont et al., 1999; Wandel et al., 2000), little is known about induction of hepatotoxicity by this compound. Also, the effect of mibefradil on other major CYP450 isoenzymes such as CYP1A and CYP2B is not known.

Acetaminophen (APAP) is a well characterized hepatotoxic drug. Acute (>150 mg/kg of body weight) or chronic overdoses of APAP represent a serious risk of severe liver damage that manifests itself by centrilobular hepatic necrosis (Guengerich et Liebler, 1985; Park et al., 2005; Latchoumycandane et al., 2007). In fact, APAP overdoses account for the leading cause of acute liver failure in most Western countries (Larson et al., 2005; Larrey and Pageaux, 2005; Tanne, 2006). Furthermore, mean peak concentrations of APAP reported after ingestion of a 650 mg dose ranged from 6 to 12 mg/L, and from 17 to 24 mg/L for a 1000 mg dose (Food and Drug Administration, 2002). Moreover, patients with a plasma concentration greater than 150 mg/ml at 4 h post ingestion are considered at possible risk of acetaminophen poisoning, whereas those with a plasma concentration greater than 300 mg/ml are considered at high risk (Jones, 1998). The mechanism of APAP-induced hepatotoxicity is initiated by the metabolism of APAP to the reactive metabolite NAPQI (for « N-acetyl-para-benzoquinone-imine ») that first depletes glutathione and then binds to the cysteines of cellular proteins including mitochondrial proteins, which ultimately leads to hepatic necrosis (Jaeschke et al., 2003; Park et al., 2005; Jaeschke et Bajt, 2006). However, the type of cell death induced by APAP overdose is now being questioned due to several reports of a possible implication of apoptosis from *in vitro* studies with hepatocytes and other human and

animal cells (Gujral et al., 2002; Jaeschke et al., 2004). This was manifested by DNA fragmentation and DNA laddering (Ray et al., 1996; Jaeschke et al., 2004), DNA strand breaks detected by TUNEL assay (Gujral et al., 2002; Jaeschke et al., 2004), morphological evidence of apoptosis in single hepatocytes by electron and light microscopy (Gujral et al., 2002; Jaeschke et al., 2004), mitochondrial cytochrome c release (Knight et Jaeschke, 2002; Jaeschke et al., 2004) and activation of caspases -3, -7, -8 and -9 (Boulares et al., 2002; Fiorucci et al., 2004; Macanas-Pirard et al., 2005).

The purpose of the present study is to investigate, in primary cultures of rat hepatocytes, the hepatotoxicity of mibefradil, including the mode and the mechanism of cell death it induces, in order to understand better its mechanism of action. Despite the fact that this compound was withdrawn from clinical use, it remains one of the most selective T-type calcium channel blockers (Asirvatham et al., 1998). This study will allow the orientation of research towards the development of similar drugs showing less toxicity. Furthermore, this work will investigate whether *in vitro* apoptotic biomarkers could be more sensitive for the detection of hepatotoxicity than currently used techniques. Pharmaceutical drug safety testing is very expensive in terms of time and cost. Toxicology studies are usually conducted in animals as the basis for predicting potential human toxicities. The development of more sensitive *in vitro* biomarkers could reduce the use of animals for drug toxicity testing, as well as the time and cost involved. Detection of drug toxicity as early as possible, by means of sensitive *in vitro* biomarkers, would minimize the economic impact of withdrawing a drug late in the drug development process or from clinical use. The well-characterized drug acetaminophen is used as a reference compound for induction of hepatotoxicity.

9.2.3 Materials and Methods

Materials

Minimal essential medium (MEM), modified Leibovitz-15 (L-15) (inspired from Crabb and Li, 1985), gentamicin and trypsin-EDTA were purchased from Gibco/Life Technologies (Burlington, Ontario, CAN). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Immunocorp (Montreal, Quebec, CAN) and dithiothreitol (DTT) from ICN Pharmaceuticals Canada Ltd (Montreal, Quebec, CAN). William's medium E (WME), insulin, acetaminophen, mibefradil dihydrochloride, aflatoxin B1, carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), protease inhibitor cocktail, H-33258 and anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody were all purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri, USA). N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (Temed), acrylamide, protein molecular weight standards and protein assay dye reagent concentrate were obtained from Bio-Rad (Mississauga, Ontario, CAN). Ethoxyresorufin (EROD) and pentoxyresorufin (PROD) fluorescent substrates, as well as rhodamine 123, were obtained from Molecular Probes Inc. (Eugene, Oregon, USA). The fluorescent substrates Ac-Asp-Glu-Val-Asp-(7-amino-4-methylcoumarin) (Ac-DEVD-AMC), Z-Ile-Glu-Thr-Asp-(7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) (Z-IETD-AFC) and Ac-Leu-Glu-His-Asp-(7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) (Ac-LEHD-AFC) as well as propidium iodide (PI), were purchased from Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, California, USA). Percoll and sheep anti-mouse IgG HRP-linked antibody were obtained from GE Healthcare (Baie d'Urfée, Quebec, CAN). Goat anti-rat IgG antibody for albumin detection was purchased from Nordic (Homeby, Ontario, CAN) and antibody to rat albumin conjugated to HRP was obtained from Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, Texas, USA). Mouse monoclonal anti-cytochrome c (clone 7H8-2C12) antibody was obtained from BD Biosciences Pharmingen (San Diego, California, USA) whereas rabbit anti-Fas-associating protein with death domain (FADD) polyclonal antibody was purchased from Stressgen Bioreagents (Victoria, British Columbia, CAN). Anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (6C5: sc-32233) and anti-tubulin antibody (D-10: sc-5274) were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, California, USA).

Methods

Preparation of primary cultures of rat hepatocytes and treatment with drugs

Hepatocytes from male Sprague Dawley rats (150-250 g) were isolated by a two-step perfusion technique (Seglen, 1976). Animals were maintained and handled in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines (CCAC, Guide vol. 1, 2nd edition, 1993). Rat hepatocytes were purified by isodensity Percoll centrifugation and cell viability was measured using flow cytometry with 20 µg/ml of PI. Cell viability usually ranged between 80% and 95%. Either 340 000 or 2.8 millions of freshly isolated hepatocytes were suspended in WME containing 10% FBS and 0.5% gentamicin and were seeded respectively in 35 or 100 mm Petri dishes coated with type I collagen obtained from rat tail tendon. Cells were allowed to attach for 2 h at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂, then washed with MEM to remove dead and unattached cells. Thereafter, 2.5 ml (for 35 mm culture dishes) or 12.2 ml (for 100 mm culture dishes) of fresh L-15 medium supplemented with 0.2 µg/ml of insulin and 0.5% gentamicin were added. Subsequently, hepatocytes were incubated with or without mibefradil (5-20 µM), APAP (5-40 mM) or aflatoxin B1 (1 µM) at 37°C for periods of times ranging from 1 to 48 h. Mibefradil was dissolved in sterile nanopure water whereas APAP and aflatoxin B1 were dissolved in dimethyl sulfoxide.

Assessment of hepatocyte viability

Following drug treatment, hepatocyte membrane integrity was assessed by the determination of lactate dehydrogenase (LDH) activity in the media according to Moldeus et al. (1978). The release of LDH into the medium was quantified after 24 and 48 h following removal of the culture medium. To determine percentage of viability, total LDH release was assessed in live cells that were lysed using Triton X-100.

Assessment of hepatocyte morphology

Changes in hepatocyte morphology, relative to untreated controls, were evaluated in cells that had been exposed to mibefradil or APAP for 24 and 48 h, using an optical microscope (Nikon model TMS-F, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (Camera Coolpix E 5000 with MDC lens, Nikon, Tokyo, Japan).

Determination of albumin secretion

Following drug treatment for 24 and 48 h, albumin secretion from hepatocytes was quantified in samples of medium by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA technique) according to Uotila et al. (1981), with minor modifications. Goat anti-rat IgG antibody and anti-rabbit IgG HRP-linked antibody were used for detection of albumin. Protein concentration was determined in the supernatants using the Bradford assay (Bradford, 1976).

Determination of activity of cytochrome P450 isoenzymes CYP1A and CYP2B

After 24 and 48 h of exposure to drugs, hepatocytes (340 000 cells/ Petri dish) were incubated with 8 μM ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) (for CYP1A1) or 17 μM pentoxyresorufin-O-dealkylase (PROD) (for CYP2B) for 1 h at 37°C. Thereafter, 600 μl of supernatant were collected from each sample and ethanol was added for a final volume of 1 ml. After a 10-minute centrifugation at 14 000x g to solubilize resorufin products, the resorufin formed was measured fluorimetrically at wavelengths of 530 nm (excitation) and 585 nm (emission) (Gupta et al., 1994). Aflatoxin B1 (1 μM) was used as a positive control for the induction of both CYP1A and CYP2B. Protein concentration was determined in the supernatants (Bradford, 1976).

Morphological analysis of apoptosis and necrosis

Condensation of nuclear chromatin was visualized using H-33258 staining. This fluorescent dye complexes with condensed DNA and thereby stains apoptotic cells by blue-green fluorescence. Cells (340 000/Petri dish), that had or had not been exposed to either mibefradil or APAP for 24 or 48 h, were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with H-33258 (16 $\mu\text{g/ml}$) for 15 min in the dark. The dishes were washed again with PBS, and PI (16 $\mu\text{g/ml}$) was added just before visualization of cells by fluorescence microscopy (Carl Zeiss Ltd, Montreal, Quebec). PI is a red fluorescent probe that binds DNA and is actively excluded by apoptotic and living cells but not by necrotic cells. Photographs were taken using a digital camera (Camera 3CDD, Sony DXC-950P, Empix Imaging Inc, Mississauga, Ontario) and images were analysed by Northern Eclipse software. The fractions of apoptotic and necrotic cells were determined relative to total cells. At least 100 cells were counted per dish.

Flow cytometry analysis of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

$\Delta\Psi_m$ was measured using the fluorescent probe rhodamine 123 (Rh-123). Hepatocytes (2.8 million cells), that had been exposed or not to mibefradil for 3 h or to APAP for 1 h, were washed twice with PBS. The cells were resuspended with L-15 and then incubated with Rh-123 (600 ng/ml) for 5 min in the dark at room temperature. For positive controls, hepatocytes were incubated with FCCP (5 μM) for 25 min prior to incubation with Rh-123. Samples were washed again once and cells were detached using trypsin-EDTA supplemented with 0.2% PBS/bovine serum albumin (BSA). Each sample was centrifuged for 2 min at low speed at room temperature. Then, supernatants were removed and pellets were resuspended in L-15. PI (20 $\mu\text{g/ml}$) was added to cell suspensions stained with Rh-123, to identify necrotic cells. Cells were analysed with a FACScan flow cytometer equipped with an argon laser emitting at 488 nm (Becton Dickinson, Oxford, UK). Acquisition and analysis of data was performed using Lysis II software (Becton Dickson). Photomultiplier settings were adjusted to detect Rh-123 fluorescence on the FL1 detector and PI fluorescence on the

FL2 detector. For each sample, the mean fluorescence intensity of 10,000 live cells in FL1 was analyzed. Apoptotic cells undergo a decrease in mitochondrial membrane potential, thus incorporating less of the Rh-123 dye. Therefore, they emit less fluorescence on the FL1 detector.

Enzymatic assays of caspase activities

Hepatocytes (2.8 million), treated or not with either mibefradil for 12 h (caspases-3 and -8) or 3 h (caspase-9), or with APAP for 1 h, were washed twice with PBS, and 30 μ l of homogenisation buffer (20 mM HEPES, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, pH 7.4) freshly supplemented with 2 mM DTT was added. Lysats were homogenized manually with a hand potter (Kontes glass CO, Duall @22, Fisher, Quebec, CAN), and protein concentration was determined in the supernatants (Bradford, 1976). Caspase assays were carried out using 100 μ g of proteins in each microplate with homogenisation buffer. The microplate was incubated for 10 min at 37°C, and then the appropriate substrate was added. Assays for caspases-3, -8 and -9 were performed using the substrates Ac-DEVD-AMC (50 μ M), Z-IETD-AFC (100 μ M) and Ac-LEHD-AFC (100 μ M), respectively (Nicholson et al., 1995). Caspase activity was evaluated by monitoring the cleavage of substrates over a period of 30 minutes. Corresponding slopes were obtained at appropriate wavelengths of excitation (λ_{Ex}) and emission (λ_{Em}): λ_{Ex} of 400 nm and λ_{Em} of 505 nm for AFC release and λ_{Ex} of 380 nm and λ_{Em} of 460 nm for AMC release. A SpectraMaxGemini Spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) was used and the slopes were obtained by SOFTmax Pro software (Molecular Devices).

Subcellular fractionation and immunodetection of cytochrome c and FADD

A minimum of 2.8 million cells for immunodetection of cytochrome c and 5.6 million cells for immunodetection of FADD were washed with PBS, and homogenisation buffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA) freshly supplemented with protease inhibitors ([4-(2-aminoethyl)-benzensulfonyl fluoride] (AEBSF), pepstatin, trans-epoxysuccinyl-L-

leucylamido (4-guanido)butane (E-64), bestatin, leupeptin, aprotinin) and 0.3% β -mercaptoethanol was added. Lysates were homogenised using a hand potter (Kontes glass CO, Duall ®22, Fisher, Quebec, CAN) and were centrifuged at 280x g during 10 min at 4 °C. Supernatants were then centrifuged for 1 h at 100 000x g at 4°C to isolate the cytosolic fraction (supernatant) from the membrane fraction (pellet). The cytosolic fraction was used for detection of both cytochrome c and FADD while the membrane fraction was used to detect FADD.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of cellular proteins was performed according to Laemmli (1970). For each sample, 40 μ g of proteins were solubilised in Laemmli's sample buffer and heated at 100°C, and loaded onto a 12% (FADD) or 15% (cytochrome c) polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 130 V for 1.5 h. Following transfer of cellular proteins to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a semi-dry blotting apparatus (Millipore, Seattle, USA), non-specific sites were blocked under mild agitation, either overnight at 4°C for cytochrome c or for 1 h at room temperature for FADD, in Tris-buffered saline with Tween buffer (TBS+T) (2 mM Tris, 13.7 mM NaCl, and 0.1% Tween, pH 7.4) containing 5% (w/v) powdered skim milk. Membranes were then washed 4 times for 15 min with TBS+T and the primary antibody was added either overnight at 4°C (anti-FADD 1:4000) or for 1 h at room temperature (anti-cytochrome c 1:1000, anti-GAPDH 1:5000 and anti-tubulin 1:1000). After that, PVDF membranes were washed again and incubated for 1 h at room temperature with the appropriate secondary antibodies (goat anti-rabbit IgG for FADD and anti-mouse IgG for cytochrome c, tubulin and GAPDH) conjugated to horseradish peroxidase (HRP). Membranes were washed 4 times for 15 min and proteins were detected by chemiluminescence (HyGLO™ Chemiluminescent HRP antibody reagent, Denville Scientific Inc, Metuchen, NJ). To verify the equivalence in protein loading, the blots were probed with the anti-GAPDH antibody for the cytosolic fractions and the anti-tubulin antibody for the membrane fractions and by coloration of the membranes using Coomassie blue. Protein expression was quantified by densitometry, relative to appropriate loading controls, using a Molecular Dynamics (Sunnyvale, California, USA) scanner equipped with analytical software IP lab gel and ChemImager.

Statistical analysis

All experiments were performed at least three times with cells isolated from different animals. All data are reported as means \pm S.E.M. For determination of albumin secretion, apoptosis, necrosis, LDH release, CYP1A and CYP2B activity, statistical differences between thiabendazole-treated and untreated cells were determined using a one-way ANOVA followed by Dunnet bilateral adjustment. For analysis of membrane potential, caspases-3, -8 and -9, FADD and cytochrome c, statistical differences between control and treated groups were determined by a Student's bilateral t test.

9.2.4 Results

Mibefradil causes a decrease in viability of rat hepatocytes

LDH release from cells occurs upon membrane deterioration and represents a widely used marker to measure cell viability. Induction of cytotoxicity by mibefradil was assessed by measuring LDH release from primary cultures of hepatocytes. When hepatocytes were exposed to micromolar (5-20 μ M) concentrations of mibefradil, there was a small dose-dependent decrease in cell viability after 24 h that was more pronounced after 48 h (Fig. 9.1 A). For the reference drug APAP, loss of viability in hepatocytes occurred at millimolar concentrations of 10-40 mM after 24 and 48 h (Fig. 9.1 B). Therefore, mibefradil caused toxicity at concentrations that were 1000 fold lower than for APAP (Fig.9.1).

Subsequently, the deterioration of cell viability in drug-treated hepatocytes was confirmed by analysis of hepatocyte morphology. A transition from the characteristic large and polygonal morphology of control hepatocytes to a spheric form, was observed when hepatocytes were exposed to 15 μ M and 20 μ M mibefradil for 48 h (Fig. 9.2 A). However, there was no significant alteration of the phenotype of rat hepatocytes following treatment with 10-20 μ M mibefradil during 24 h (data not shown). After 24 h of exposure to increasing concentrations of APAP, we observed phenotypic changes which became evident with 20 mM and 40 mM. These changes were slightly more pronounced after 48 h (Fig. 9.2 B).

Mibefradil inhibits albumin secretion in primary cultures of rat hepatocytes

Albumin secretion, which is a typical hepatospecific function of differentiated hepatocytes, was assessed in order to evaluate the effects of mibefradil on the metabolic activity of rat hepatocytes. Exposure of isolated hepatocytes to mibefradil for 24 and 48 h resulted in a dose-dependent decrease in albumin synthesis. There was a 2-fold decrease in albumin synthesis in the presence of 20 μ M mibefradil (Fig. 9.3 A), compared to a 3-fold decrease induced by 40 mM APAP (Fig. 9.3 B), relative to control cells.

Mibefradil induces CYP2B activity and inhibits CYP1A activity

It is well established that mibefradil inhibits CYP3A activity. CYP1A and CYP2B are major CYP isoenzymes that are known to be induced by a variety of xenobiotics in rat hepatocytes (Ortiz de Montellano, 1995; Madan et al., 1999). There was no effect of mibefradil on CYP1A activity (Fig. 9.4 A). However, there was a small induction of CYP2B activity by 20 μ M mibefradil (Fig. 9.4 C), as shown by an increase in PROD activity. The reference drug APAP activated CYP1A (Fig. 9.4 B) and CYP2B (Fig. 9.4 D) in a dose-dependent manner from 20 to 40 mM. Aflatoxin B1 (1 μ M) was used as a positive control for induction of both CYP1A (Fig. 9.4 E) and CYP2B (Fig. 9.4 F) activities. The level of induction of CYP2B by mibefradil (Fig. 9.4 C) was small compared to the induction by APAP and aflatoxin B1.

Mibefradil causes cell death by apoptosis and necrosis in primary cultures of rat hepatocytes

Subsequently, the type of cell death (i.e., apoptosis or necrosis) induced by mibefradil was investigated in primary cultures of rat hepatocytes. Morphological assessment of apoptosis was analyzed by the condensation of nuclear chromatin using the fluorescent probe H-33258 (blue-green) whereas necrosis was revealed by the fluorescent probe PI (red). Mibefradil (Fig. 9.5 A-G) induced both apoptosis and necrosis. Overall, there was a time- and concentration-dependent decrease in cell viability when hepatocytes were exposed to mibefradil (Fig. 9.5 F and G). After a 24-h exposure of hepatocytes to mibefradil, cell death occurred predominantly by apoptosis (Fig. 9.5 F). At a higher concentration (20 μ M), apoptosis and necrosis were induced almost equally (Fig. 9.5 F). When cells were exposed to mibefradil for 48 h, the level of apoptosis decreased, whereas the percentage of necrotic cells increased with increasing concentrations of drug (Fig. 9.5 G). Similar findings were found when hepatocytes were exposed to APAP for 24 or 48 h (Fig. 9.5 H-M). At 48 h, the level of necrotic cells increased whereas the percentage of apoptosis decreased (Fig. 9.5 M), compared to what was found after 24 h of exposure to APAP (Fig. 9.5 L). It should be noted that for both mibefradil and APAP, apoptosis occurred at earlier incubation times (24 h), compared to necrosis.

Activation of the death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis by mibefradil

The following step was to explore the activation of the death receptor and mitochondrial apoptotic signaling pathways by mibefradil. The death receptor pathway involves the translocation of FADD from the cytosol to membranes and activation of initiator caspase-8. The mitochondrial pathway involves a decrease in $\Delta\Psi_m$, release of cytochrome c from mitochondria into the cytosol, and activation of initiator caspase-9. Activation of the receptor pathway of apoptosis was confirmed by the translocation of adaptor protein FADD from the cytosol to membranes, following exposure of rat hepatocytes to mibefradil (5 μ M, 12 h) (Fig. 9.6 A,B). Optimal times of exposure to mibefradil and APAP for induction of caspase-8 activity in hepatocyte cultures were determined by a kinetic study over 24 h (data not shown). Exposure of hepatocytes to 5 μ M mibefradil for 12 h (Fig. 9.7 A) caused a 2-fold increase in caspase-8 activity, relative to untreated control cells. When hepatocytes were treated with 5 mM APAP for 1 h, FADD was also translocated to the membrane (Fig. 9.6 C-D) and there was a 2-fold increase in activity of caspase-8 (Fig. 9.7 B).

Activation of the mitochondrial pathway by mibefradil was confirmed by its ability to trigger $\Delta\Psi_m$ collapse and the liberation of cytochrome c into the cytosol. Exposure of cells to 5 μ M mibefradil for 3 h (Fig. 9.8 A,B) led to a decrease in Rh-123 fluorescence, relative to control hepatocytes. Furthermore, exposure of rat hepatocytes to 5 μ M mibefradil for 3 h caused the release of cytochrome c into the cytosol (Fig. 9.8 C). Optimal times of exposure to mibefradil and APAP for induction of caspase-9 activity in hepatocyte cultures were determined by a kinetic study over 24 h (data not shown). Caspase-9 activity increased after 3 h when cells were exposed to 5 μ M mibefradil (1.2-fold increase) (Fig. 9.9 A), compared with untreated controls. Exposure of cells to 5 mM APAP for 1 h also caused a loss of $\Delta\Psi_m$ (Fig. 9.8 D-E), liberation of cytochrome c (Fig. 9.8 F) and activation of caspase-9 (Fig. 9.9 B).

Activation of the execution phase of apoptosis by mibefradil and APAP

Caspase-3 is the main executioner of apoptosis, generally playing a crucial role in the dismantlement of cells undergoing this mode of cell death. Optimal times of exposure to mibefradil and APAP for induction of caspase-3 activity in hepatocyte cultures were determined by a kinetic study over 24 h (data not shown). Following exposure of rat hepatocytes to mibefradil (5 μ M, 12 h) (Fig. 9.10 A), there was a 1.2-fold increase in caspase-3 activity, relative to untreated controls. The reference drug APAP (5 mM, 1 h) also caused a similar increase in caspase-3 activity (Fig. 9.10 B).

9.2.5 Discussion

The present study was aimed at investigating the hepatotoxicity of mibefradil and expanding our knowledge about the mode and the mechanism of cell death this drug might trigger, by using primary cultures of rat hepatocytes as an *in vitro* model. The well characterized hepatotoxic drug APAP was used as a reference compound. This is the first study to report the effect of mibefradil on cell viability of hepatocytes. First, by dosing LDH released from cells with damaged membranes, exposure to mibefradil for 24 h and 48 h led to a concentration- and time-dependent decrease in cell viability. The results obtained with APAP are in agreement with several published studies in which a decrease in cell viability after exposure of rat hepatocytes to 10-20 mM concentrations of this drug was reported (McCloskey et al., 1999; Nakagiri et al, 2003). For example, these authors reported that cell viability was 91.1% with 10 mM APAP, and 64.7% with 20 mM APAP at 48 h in cultured rat hepatocytes. However, Thedinga et al. (2007) reported that exposure of human hepatocytes to 50-2815 mg/l (0.66-18.6 mM) APAP over a period of 24 h had no effect on cellular viability.

The assessment of cytotoxicity by quantification of LDH was confirmed by optical microscopy with observations of morphologic changes and by time- and concentration-dependent increase in PI-stained necrotic cells, when hepatocytes were exposed to mibefradil. Whereas no evaluation of necrosis in hepatic cells exposed to mibefradil has been published before, Kon et al. (2004) determined via PI fluorimetry that administration of 10 mM APAP caused time-dependent necrotic cell killing in cultured mouse hepatocytes, with an increase in necrosis to 74% after 16 h.

The present study is the first to report results of decreased metabolism, which was manifested by a decrease in albumin production when hepatocytes were exposed to mibefradil over 24 and 48 h. Our findings for APAP are consistent with several studies reporting a diminution of albumin synthesis in isolated hepatocytes exposed to this drug. For instance, Shen et al. (2006) reported a decrease in albumin secretion of 54% at 48 h with 2.5

mM of APAP, relative to control cells. In studies with human hepatocytes, Thedinga et al. (2007) and Ullrich et al. (2007) reported that high doses of APAP (2815 mg/ml or 18.6 mM) diminished albumin secretion by 70-80% after 24 h of exposure.

It is important to know the effects of drugs on all CYP450 isoforms, especially the major ones involved in metabolism, since this knowledge may help prevent adverse drug interactions. In our study, there was no effect of mibefradil on CYP1A activity in rat hepatocytes, whereas there was an induction of CYP2B1/2 activity in a time- and concentration-dependent fashion. However, we found that APAP induced CYP1A1/2 and CYP2B1/2 activities in a time- and concentration-dependent fashion. APAP is known to induce CYP1A2 activity in rat liver (Plewka et al., 2000). Even though activation of PROD by mibefradil or APAP has never been demonstrated in any study, it was reported that APAP is partly metabolized by CYP2B1/2 in rat hepatocytes (Rumack, 2002; Farkas and Tannenbaum, 2005). Thus, induction of PROD with APAP could be explained by the fact that increasing amounts of APAP are bioactivated into NAPQI by CYP2B1/2, with increasing concentrations of drug and time of exposure.

The present study demonstrates for the first time that mibefradil can induce apoptosis in rat hepatocytes. This induction was confirmed morphologically by the condensation of nuclear chromatin, a later event in the apoptotic cascade. Apoptosis was apparent at the earlier time (24 h) and low drug concentrations (5-10 μ M mibefradil) whereas necrosis increased at higher concentrations and at 48 h. This shows that the markers for apoptosis are much more sensitive than those used to detect necrosis (LDH, PI, morphologic changes). The fact that mibefradil induces either apoptosis or necrosis in a dose-related fashion is consistent with the knowledge that apoptosis and necrosis induced by toxins constitutes a two-stage continuum (Kroemer et al., 1998). Furthermore, these results support the role of apoptosis in mibefradil-induced hepatotoxicity. Our findings suggest that mibefradil initially induced cell death by apoptotic processes, which switched into necrosis with time and increased concentrations of the compound, probably due to declining levels of ATP; this phenomenon is known as necroptosis (Lemasters, 1999; Selzner et al., 2003). On the other hand, an additional explanation for our results could be that apoptotic cells are phagocytosed by

macrophages and/or surrounding cells (Jaeschke et al., 2004; Schattenberg et al., 2006), and therefore disappear. However, even though Nebe et al. (2004) found that mibefradil (20 μ M, 4 h) triggers apoptotic cell death in human lens epithelial cells, the present article is the first showing an induction of apoptosis by this compound in hepatic cells.

In addition, Vaccarino et al. (2007) found by Hoechst staining that APAP triggered apoptotic cell death in HepG2 cells exposed to 100 μ M APAP over 6-8 h. Chromatin condensation was also observed after exposure of human HuH7 hepatoma cells to 5 and 10 mM APAP over 24 and 48 h (Macanas-Pirard et al., 2005). Moreover, Kon et al. (2007) reported that exposure of cultured mouse hepatocytes to 10 mM APAP over 16 h led to significant DNA fragmentation (i.e.: $37 \pm 5\%$ of cells TUNEL [Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling] positive, compared to untreated hepatocytes). Also, Fiorucci et al. (2004) observed that exposure of primary cultures of mouse hepatocytes to 6.6 mM APAP leads predominantly to apoptosis in the first hours (1-8 h), whereas necrosis prevails over apoptosis at later times (8-24 h). However, other published studies (Gujral et al., 2002; Jaeschke et al., 2005) do not support this hypothesis.

Moreover, our results show that mibefradil induces both the mitochondrial and death receptor pathways of apoptosis. The induction of the mitochondrial pathway by mibefradil was measured by a decrease in $\Delta\Psi_m$ and by the liberation of cytochrome c from mitochondria into the cytosol. Mibefradil was found to induce depolarization of membrane potential in human lens epithelial cells (Nebe et al., 2004). However, a loss of $\Delta\Psi_m$ and cytochrome c release have already been reported following exposure of mouse hepatocytes to 6.6 mM APAP for 8 h (Fiorucci et al., 2004). Also, Kon et al. (2004) measured mitochondrial depolarization approximately 4.5 h following treatment of primary cultures of mouse hepatocytes with 10 mM APAP whereas Bedda et al. (2003) reported that cytochrome c release into cytosolic fractions prepared from livers of mice intoxicated with 500 mg/kg APAP was increased approximately 6 fold, compared with controls.

In the mitochondrial pathway of apoptosis, the release of cytochrome c triggers the activation of initiator caspase-9. Indeed, our study demonstrates for the first time an

induction of the activity of caspase-9 by mibefradil (5 μ M), after 3 h of exposure. Moreover, APAP (5 mM, 1 h) also induced the activation of caspase-9, which is in agreement with a report by Fiorucci et al. (2004).

The death receptor pathway of apoptosis involves membrane receptors like Fas (Yin et Dong, 2003) that are activated upon ligand binding and recruit an adaptor protein such as FADD. FADD then translocates from the cytosol to membranes (Hengartner, 2000; Mirkes, 2002; Yin et Dong, 2003) and recruits in turn procaspase-8 to form the death inducing signaling complex (DISC) along with Fas receptor; at the DISC, initiator caspase-8 becomes activated (Wang et al., 2005). Indeed, our study showed for the first time that mibefradil (5 μ M, 12 h) induced the relocation of FADD into membranes and the activation of caspase-8. The induction of caspase-8 activity in hepatocytes by APAP has already been reported (Boulares et al., 2002; Fiorucci et al., 2004). In addition, we observed the relocation of FADD into membranes after 1 h with APAP (5 mM). Actually, it has been reported that subliminal Fas stimulation increases hepatotoxicity of APAP in mice, which strongly suggests that APAP-induced toxicity in the liver involves the death receptor pathway triggered by Fas (Tinel et al., 2004). Moreover, Tagami et al. (2003) measured increased concentrations of the soluble form of Fas (sFas) in the serum of patients with acute liver failure due to APAP overdose, which further argues for the activation of Fas-mediated apoptosis in the liver during APAP-induced hepatotoxicity. Furthermore, Vaccarino et al. (2006) demonstrated that APAP was associated with significant Fas-ligand up regulation in the HepG2 cell line (100 μ M APAP, 6-8 h) and in human primary cultures of normal liver cells (50-100 μ M APAP, 6-8h).

The mitochondrial and death receptor pathways both converge on the activation of caspase-3, the major effector caspase involved in apoptosis (Mirkes, 2002; Yin et Dong, 2003). We found that caspase-3 activity was indeed induced by mibefradil (5 μ M, 12 h). Caspase-3 induction by APAP has already been reported in cultured mouse hepatocytes (Kon et al., 2004; Kon et al., 2007), cytosolic fractions prepared from livers of mice intoxicated with 500 mg/kg APAP (Bedda et al., 2003) and human hepatoma cell lines (Boulares et al., 2002; Boulares and Ren, 2004; Macanas-Pirard et al., 2005). Nevertheless, a number of

studies reported no or little activation of caspases by this drug. For example, Lawson et al. (1999) found that APAP did not activate caspase-3 in mice liver *in vivo*. On the contrary, they observed that when the anti-Fas antibody Jo-2 was injected, there was a 28-fold increase in caspase activation and hence suggested that APAP metabolism potentially inhibits Fas receptor-induced caspase activation and apoptosis in the liver. Knight and Jaeschke (2002) then reported that the extent of mitochondrial dysfunction induced by APAP might be responsible for preventing Fas receptor-mediated caspase activation and apoptosis. In fact, Gujral et al. (2002) demonstrated in an *in vivo* study that more than 95% of hepatocytes exposed to APAP overdose die through necrosis.

Our findings show that it was possible to detect hepatotoxic effects of mibefradil, by means of markers in the apoptotic cascade, at doses where toxicity was not detectable by classical tests such as LDH release. After exposure of hepatocytes to 20 μ M mibefradil for 24 h, toxicity was barely detectable using LDH. Toxicity of lower doses (5 to 10 μ M) was not detected using LDH. Consistent with these data, necrosis was only detected using PI at 20 μ M. The trypan blue exclusion test is commonly used to assess hepatotoxicity, but this is also a marker of severe damage to the plasma membrane, such as occurs during necrosis. However, toxicity of 5 μ M mibefradil was detected by all of the apoptotic markers: caspase activation, mitochondrial membrane depolarization, translocation of FADD and cytochrome c, and Hoescht staining. An important finding from this study is that molecular changes in the apoptotic cascade are more sensitive biomarkers than the classical tests. These biomarkers could be very useful for *in vitro* assays that could be developed for the early detection of hepatotoxicity during the drug development process.

In conclusion, this is the first study to provide an assessment of the hepatotoxicity of mibefradil (viability, albumin secretion), as well as a detailed investigation of the type and the mechanism of cell death induced by this drug. We show that when compared with APAP, on a molar basis, mibefradil leads to more pronounced morphological changes and decreases in viability and metabolism (decrease in albumin secretion) of hepatocytes. However, there was an increase in necrosis which was more pronounced with mibefradil than with APAP. In addition, apoptosis was induced through both the receptor and the mitochondrial pathways

with the two drugs. Induction of apoptosis was manifested by activation of caspases-3, -8 and -9 and $\Delta\Psi_m$ collapse, and by relocation of cytochrome c from mitochondria to the cytosol and of FADD from the cytosol to membranes. Our results clearly demonstrate that mibefradil (5 to 20 μM), at similar concentrations than the recommended daily dosage in humans (i.e.: 18.71 or 37.42 μM) (Massie et al., 1997; Kobrin et al., 1997; Massie et al., 1998), is more hepatotoxic than the well-characterized drug APAP. These findings improve our understanding of the mechanism of toxicity of mibefradil, which could be useful for developing similar drugs exhibiting less hepatotoxicity.

9.2.6 Acknowledgements

Financial support was obtained from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) INNOV, Gestion Valeo, and Valorisation Recherche Quebec (VRQ). The authors thank Mr. Bertrand Fournier (SCAD, UQÀM), who performed the statistical analyses.

9.2.7 References

- Asirvatham S, Sebastian C and Thadani U (1998) Choosing the Most Appropriate Treatment for Stable Angina: Safety Considerations. *Drug Saf.* **19**:23-44.
- Bader A, Knop E, Boker KH, Crome O, Fruhauf N, Gonschior AK, Christians U, Esselmann H, Pichlmayr R and Serwing KF (2004) Tacrolimus (FK506) biotransformation in primary rat hepatocytes depends on extracellular matrix geometry. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* **353**:461-473.
- Bedda S, Laurent A, Conti F, Chéreau C, Tran A, Tran-Van Nhieu J, Jaffray P, Soubrane O, Goulvestre C, Calmus Y, Weill B and Batteux F (2003) Mangafodipir prevents liver injury induced by acetaminophen in the mouse. *J Hepatol* **39**:765-72.
- Bernik PJLM, Prager G, Schelling A and Kobrin I (1996) Antihypertensive properties of the novel calcium antagonist mibefradil (Ro 40-5967). *Hypertension* **27**:426-432.
- Billups SJ and Carter BL (1998) Mibefradil : a new class of calcium-channel antagonists. *Ann Pharmacother* **32**:659-671.
- Boulares AH and Ren T (2004) Mechanism of acetaminophen-induced apoptosis in cultured cells: Roles of caspase-3, DNA fragmentation factor, and the Ca^{2+} and Mg^{2+} endonuclease DNASE1L3. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **94**:19-29.
- Boulares AH, Zoltski AJ, Stoica BA, Cuvillier O and Smulson ME (2002) Acetaminophen induces a caspase-dependent and Bcl-x_L sensitive apoptosis in human hepatoma cells and lymphocytes. *Pharmacol Toxicol* **90**:38-50.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Caraceni P and Van Thiel DH (1995) Acute liver failure. *Lancet* **345**:163-9.
- Carter DC and Ho JX (1994) Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* **45**:153-203.
- Farkas D and Tannenbaum SR (2005) Characterization of chemically induced hepatotoxicity in collagen sandwiches of rat hepatocytes. *Toxicol Sci* **85**:927-34.
- Fingerote RJ and Bain VG (1993) Fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* **88**:1000-10.
- Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Mencarelli A, Farneti S, Del Soldato P and Morelli A (2004) Liver delivery of NO by NCX-1000 protects against acute liver failure and mitochondrial dysfunction induced by APAP in mice. *Br J of Pharmacol* **143**:33-42.
- Food and Drug Administration. 2002. "Open APAP. McNeil Consumer & Specialty

Pharmaceuticals", http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/briefing/3882B1_13_McNeil-Acetaminophen.pdf, (January 15th, 2008).

Guengerich FP and Liebler DC (1985) Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites. *CRC Crit Rev Toxicol* **14**:259-307.

Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML and Jaeschke H (2002) Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice : apoptosis or oncotic necrosis ? *Toxicol Sci* **67**:322-28.

Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Vaidya S, Irani AN and Gorla GR (1999) Position-specific gene expression in the liver lobule is directed by the microenvironment and not by the previous cell differentiation state. *J Biol Chem* **274**:2157-2165.

Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**:770-6.

Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S and Livingston ED (2007) Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* **139**:143-156.

Jaeschke H and Bajt ML (2006) Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci* **89**:31-41.

Jaeschke H, Gujral JS and Bajt ML (2004) Apoptosis and necrosis in liver disease. *Liver Int* **24**:85-89.

Jaeschke H, Knight TR and Bajt ML (2003) The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Lett* **144**:279-88.

Jones AL (1999) Mechanisms of action and value of N-acetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: a critical review. *Clin Toxicol* **36**:277-285.

Kam PCA and Ferch NI (2000) Apoptosis : mechanisms and clinical implications. *Anesthesia* **55**: 1081-1093.

Knight TR and Jaeschke H (2002) Acetaminophen-induced inhibition of Fas receptor-mediated liver cell apoptosis: mitochondrial dysfunction versus glutathione depletion. *Toxicol Appl Pharmacol* **181**:133-141.

Kon K, Ikejima K, Okumura K, Tomonori A, Arai K, Takei Y, Lemasters JJ and Sato N (2007) Role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *J Gastroenterol Hepatol* **22 Suppl 1**:S49-S52.

Kon K, Kim JS, Jaeschke H and Lemasters JJ (2004) Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* **40**:1170-1179.

- Krauss G (2001) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 3rd ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- Kroemer G, Dallaporta B and Resche-Rigon M (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* **60**:619-42.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**:99-163.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-885.
- Larrey D and Pageaux GP (2005) Drug-induced acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **17**:141-143.
- Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, Reisch JS, Schiodt FV, Ostapowicz G, Shakil AO and Lee WM (2005) Acetaminophen-induced acute liver failure : results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology* **42**:1364-72.
- Latchoumycandane C, Goh CW, Ong MM and Boelsterli UA (2007) Mitochondrial protection by the JNK inhibitor leflunomide rescues mice from acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology* **45**:412-21.
- Lawson JA, Fisher MA, Simmons CA, Farhood A and Jaeschke H (1999) Inhibition of Fas receptor (CD95)-induced hepatic caspase activation and apoptosis by acetaminophen in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **156**:179-186.
- Lemasters JJ (1999) Mechanisms of hepatic toxicity V. necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* **276**: G1-6.
- Lichten SM (2006) Therapy insight: therapeutic challenges in the treatment of elderly cancer patients. *Nat Clin Pract Oncol* **3**:86-93.
- Ma B, Prueksaritanont T and Lin JH (2000) Drug interactions with calcium channel blockers: possible involvement of metabolite-intermediate complexation with CYP3A. *Drug Metab Dispos* **28**:125-30.
- Macanas-Pirard P, Yaacob NS, Lee PC, Holder JC, Hinton RH and Kass GE (2005) Glycogen synthase kinase-3 mediates acetaminophen-induced apoptosis in human hepatoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **313**:780-9.
- Madan A, Dettaan R, Midra D, Carroll K, LeCluyse E and Parkinson A (1999) Effect of cryopreservation on cytochrome P-450 enzyme induction in cultures rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **27**:327-35.

Massie BM (1998) Mibefradil, a T-type channel-selective calcium antagonist: clinical trials in chronic stable angina pectoris. *Am J Hypertens* **11**:95-102.

McCloskey P, Edwards RJ, Tootle R, Selden C, Roberts E and Hodgson, HJF (1999) Resistance of three immortalized human hepatocyte cell lines to acetaminophen and *N*-acetyl-p-benzoquinoneimine toxicity. *J Hepatol* **31**:841-51.

Meeks RG, Harrison SD and Bull RJ (1991) *Hepatotoxicology*. CRC Press, Boca Raton.

Mirkes PE (2002) Warkany lecture : To die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development. *Teratology* **65**:228-239.

Moldeus P, Hogberf J and Orrenius S (1978) Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol* **52**:60-71.

Nakagiri R, Oda H and Kamiya T (2003) Small scale rat hepatocyte primary culture with applications for screening hepatoprotective substances. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**:1629-1635.

Nebe B, Kunz F, Peters A, Rychly J, Noack T and Beck R (2004) Induction of apoptosis by the calcium antagonist mibefradil correlates with depolarization of the membrane potential and decreased integrin expression in human lens epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **242**:597-604.

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL and Miller DK (1995) Identification and inhibition of ICE/Ced-3 proteases necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **76**:37-43.

Olesky WG (2001) *The Circulatory system*. The Rosen Publishing Group, New York.

Oparil S, Kobrin I, Abernethy DR, Levine BS, Reif MC and Shepherd AM (1997) Dose-response characteristics of mibefradil, a novel calcium antagonist, in the treatment of essential hypertension. *Am J Hypertens* **10**: 735-742.

Ortiz de Montellano PR (1995) *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry*, 2nd edition. Plenum Press, New York.

Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M and Williams DP (2005) The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**:177-202.

Price RJ, Scott MP, Walters DG, Stierum RH, Groten JP, Meredith C and Lake BG (2004) Effect of thiabendazole on some rat hepatic xenobiotic metabolizing enzymes. *Food Chem Toxicol* **42**:899-908.

Prueksaritanont T, Ma B, Tang C, Meng Y, Assang C, Lu P, Reider PJ, Lin JH and Baillie TA (1999) Metabolic interactions between mibefradil and HMG-CoA reductase inhibitors: an in vitro investigation with human liver preparations. *Br J Clin Pharmacol* **47**:291-98.

Ray SD, Mumaw VR, Raje RR and Fariss MW (1996) Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. *J Pharmacol Exp Ther* **279**:1470-83.

Rumack BH (2002) Acetaminophen-induced hepatotoxicity : the first 35 years. *J Toxicol Clin Toxicol* **40**:3-20.

Schattenberg JM, Galle PR and Schuchmann M (2006) Apoptosis in liver disease. *Liver Int* **26**:904-911.

Seglen PO (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* **13**:29-83.

Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA (2003) Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* **125**:917-936.

Shen C, Zhang G, Qiu H and Meng Q (2006) Acetaminophen-induced hepatotoxicity of gel entrapped rat hepatocytes in hollow fibers. *Chem-Biol Interact* **162**:53-61.

Tagami A, Ohnishi H and Hugues RD (2003) Increased serum soluble Fas in patients with acute liver failure due to paracetamol overdose. *Hepatogastroenterology* **50**:742-45.

Tanne J (2006) Paracetamol causes most liver failure in UK and US. *BMJ* **332**:628.

Thedinga E, Ullrich A, Drechsler S, Niendorf ., Kob A, Runge D, Keuer A, Freund I, Lehmann M and Ehret (2007) In vitro System for the prediction of hepatotoxic effects in primary hepatocytes. *ALTEX* **24**:22-34.

Tinel M, Berson A, Vadrot N, Descatoire V, Grodet A, Feldmann G, Thénot JP and Pessayre D (2004) Subliminal Fas stimulation increases the hepatotoxicity of acetaminophen and bromobenzene in mice. *Hepatology* **39**:655-66.

Ullrich A, Berg C, Hengstler JG and Runge D (2007) Use of a standardised and validated long-term human hepatocyte culture system for repetitive analyses of drugs: repeated administrations of acetaminophen reduces albumin and urea secretion. *ALTEX* **24**:35-40.

Uotila M, Ruolahti E and Engwall E (1981) Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein. *J Immunol Methods* **42**:11-15.

Vaccarino AL, Paul D, Mukherjee PK, Rodriguez de Turco EB, Marcheselli VL, Xu L, Trudell ML, Minguez JM, Matia MP, Sunkel C, Alvarez-Builla J and Barzan NG (2007)

- Synthesis and in vivo evaluation of non-hepatotoxic acetaminophen analogs. *Bioorg Med Chem* **15**:2206-15.
- Wandel C, Kim RB, Guengerich P and Wood AJ (2000) Mibefradil is a P-glycoprotein substrate and a potent inhibitor of both P-glycoprotein and CYP3A in vitro. *Drug Metab Dispos* **28**: 895-98.
- Wang ZB, Liu YQ and Cui Y (2005) Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* **29**:489-496.
- Welker HA, Weidekamm E, Houwing N and de Chatel R (1998a) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mibefradil in hypertensive patients with varying degrees of renal insufficiency. *Pharmacology* **56**:297-307.
- Welker HA, Wiltshire H and Bullingham R (1998b) Clinical pharmacokinetics of mibefradil. *Clin Pharmacokinet* **35**:405-423.
- Wiltshire HR, Sutton BM, Heeps G, Betty AM, Angus DW, Madigan MJ and Sharp SR (1997) Metabolism of calcium antagonist, mibefradil (POSICOR, Ro 40-5967). Part II. Metabolism in hepatic microsomes from rat, marmoset, cynomolgus monkey, rabbit and man. *Xenobiotica* **27**:539-556.
- Yin XM and Dong Z (2003) *Essentials of apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*. Humana Press, Totowa.
- Zornig M, Hueber AO, Baum W and Evan G (2001) Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1551**:F1-F37.

9.2.8 Figure legends

Figure 9.1 : Decreased viability of rat hepatocytes exposed to mibefradil or APAP. Hepatocytes (340 000 cells) were incubated with either (A) 5-20 μ M of mibefradil or (B) 10-40 mM of APAP for 24 and 48 h at 37 °C. Hepatocyte viability was assessed as a measure of LDH release in the media. Control cells were cultured without drugs. Error bars represent means \pm S.E.M. from 7 (mibefradil) or 11 (APAP) separate experiments performed in hepatocytes prepared from 7 or 11 different rats, respectively. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P<0.001$ (***) or $P<0.05$ (*) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.2 : Effects of mibefradil or APAP on rat hepatocyte morphology. Hepatocytes (340 000 cells) were incubated with either (A) 10-20 μ M of mibefradil or (B) 10-40 mM of APAP for 24 or 48 h at 37 °C. Representative photographs are shown from 3 independent experiments. Magnification: 320x

Figure 9.3 : Mibefradil and APAP inhibit albumin secretion in rat hepatocytes. Albumin secretion by hepatocytes (340 000 cells) was quantified by an ELISA assay after 24 and 48 h of incubation with either (A) 5-20 μ M of mibefradil or (B) 10-40 mM of APAP at 37 °C. Control cells were cultured without drugs. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 (mibefradil) or 7 (APAP) separate experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P<0.001$ (***) or $P<0.01$ (**) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.4 : Effects of mibefradil and APAP on CYP1A and CYP2B activities in rat hepatocytes. Hepatocytes (340 000 cells) were incubated with either (A,C) 5-20 μ M of mibefradil or (B,D) 10-40 mM of APAP for 24 and 48 h at 37 °C. CYP1A and CYP2B activities were determined as measures of EROD and PROD activities, respectively. (A-F) Control cells were cultured without drugs. (E,F) Aflatoxin B1 (1 μ M) was used as a positive control. Data at each drug concentration are presented relative to the initial PROD activity assessed just after initiating hepatocyte cultures. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 independent experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P<0.001$ (***), $P<0.01$ (**) or $P<0.05$ (*) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.5 : Morphological analysis of apoptosis and necrosis in rat hepatocytes following exposure to mibefradil or APAP. Cells (340 000/Petri dish) were incubated with (A) 0, (B) 5, (C) 10, (D) 15 and (E) 20 μ M of mibefradil or with (H) 0, (I) 10, (J) 20 and (K) 40 mM of APAP, for 48 h at 37 °C. Control cells were cultured without drugs. Hepatocytes were stained with H-33258 and PI and visualized by fluorescence microscopy (magnification 320 x). The fraction of apoptotic and necrotic cells following exposure to mibefradil for (F) 24 h and (G) 48 h or to APAP for (L) 24 h and (M) 48 h are given relative to total cells. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 (APAP) or 4 (mibefradil) different experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P<0.001$ (***), $P<0.01$ (**) or $P<0.05$ (*) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.6 : Translocation of FADD from the cytosol to membranes induced by mibefradil and APAP in rat hepatocytes. Hepatocytes (2.8×10^6 cells) were incubated with either (A, B) mibefradil (5 μ M, 12 h) or (C, D) APAP (5 mM, 1 h). The immunodetection of FADD was carried out by SDS-PAGE, using GAPDH (for cytosolic fractions) and β -tubulin (for membrane fractions) as loading controls. The expression of FADD is presented relative to untreated control cells. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 (mibefradil) or 4 (APAP) separate experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P < 0.05$ (*) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.7 : Activation of initiator caspase-8 by mibefradil and APAP in rat hepatocytes. Hepatocytes (2.8×10^6 cells) were incubated with either (A) mibefradil (5 μ M, 12 h) or (B) APAP (5 mM, 1 h). Enzymatic activity of caspase-8 is expressed relative to the activity obtained for untreated control cells. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 independent experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P < 0.001$ (***) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.8 : Induction of $\Delta\Psi_m$ depolarization and liberation of cytochrome c by mibefradil and APAP in rat hepatocytes. Hepatocytes (2.8×10^6 cells) were incubated with (A-C) 5 μ M mibefradil for 3 h or with (D-F) 5 mM APAP for 1 h at 37°C. Fluorescence intensity is presented for (A,B) mibefradil and (D,E) APAP relative to untreated control cells cultured in serum free medium alone. FCCP (5 μ M) was used as a positive control for membrane depolarization (B,E). Immunodetection of cytochrome c was carried out, using GAPDH as a loading control. The expression of cytochrome c is presented relative to untreated control cells. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 separate experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P < 0.05$ (*) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.9 : Activation of initiator caspase-9 by mibefradil and APAP in rat hepatocytes. Hepatocytes (2.8×10^6 cells) were incubated with either (A) mibefradil (5 μ M, 3 h) or (B) APAP (5 mM, 1 h). Enzymatic activity of caspase-9 is expressed relative to the activity obtained for untreated control cells cultured in serum free medium alone. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 independent experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P < 0.001$ (***) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.10 : Activation of executor caspase-3 by mibefradil and APAP in rat hepatocytes. Hepatocytes (2.8×10^6 cells) were incubated with either (A) mibefradil (5 μ M, 12 h) or (B) APAP (5 mM, 1 h). Enzymatic activity of caspase-3 is expressed relative to the activity obtained for untreated control cells. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 separate experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P < 0.01$ (**) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

9.2.9 Figures

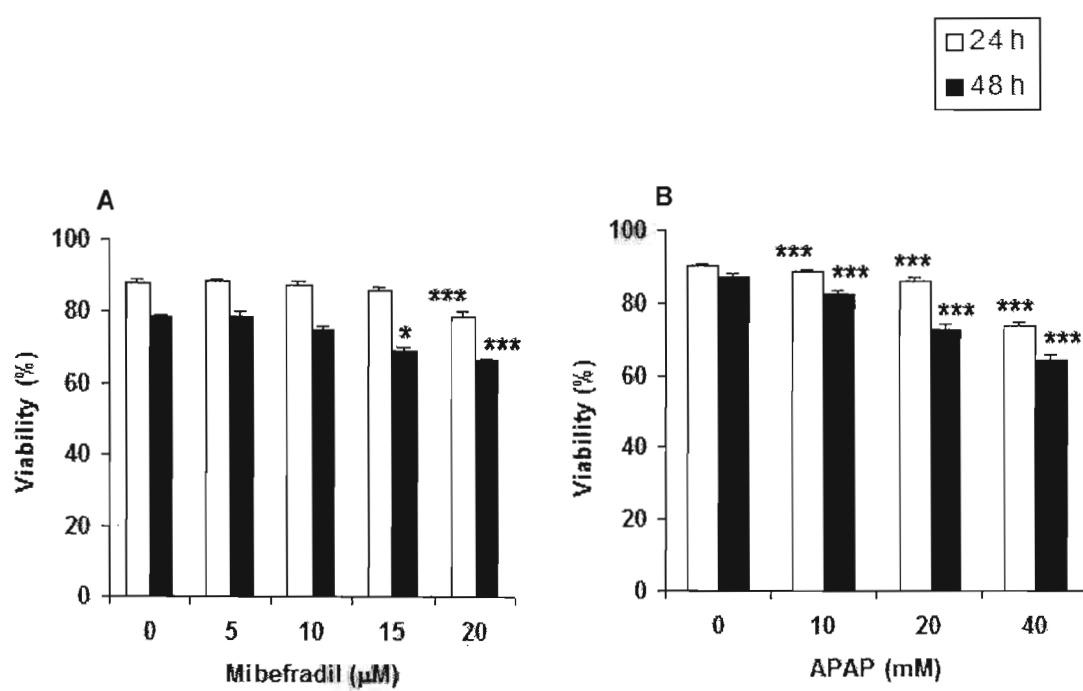


Fig. 9.1. Decreased viability of rat hepatocytes exposed to mibefradil or APAP.

Mibefradil**A****24 h****48 h****0 μM****10 μM****15 μM****20 μM**

Fig. 9.2. Effects of mibefradil or APAP on rat hepatocyte morphology.

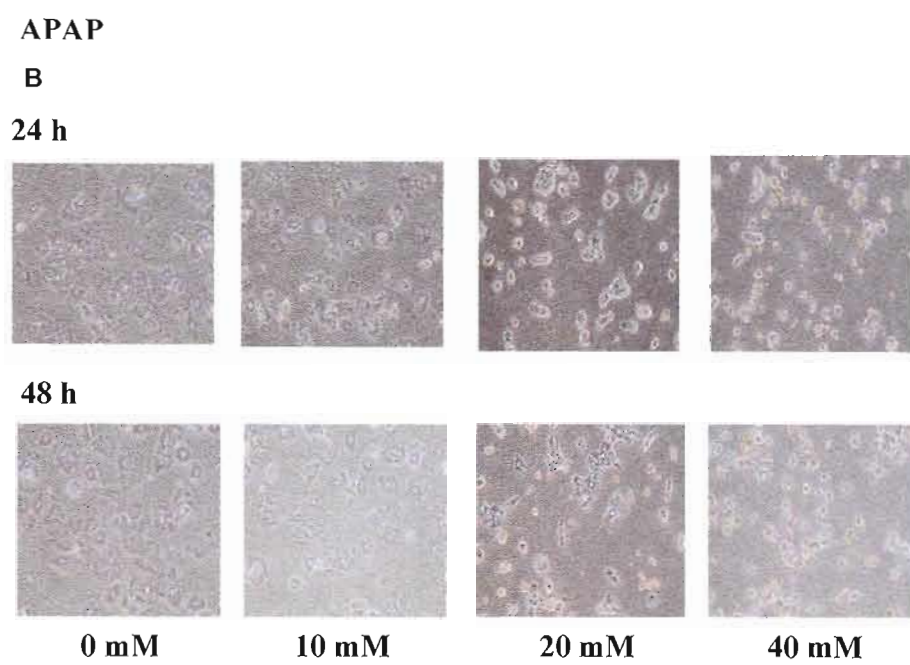


Fig. 9.2. Effects of mibefradil or APAP on rat hepatocyte morphology.

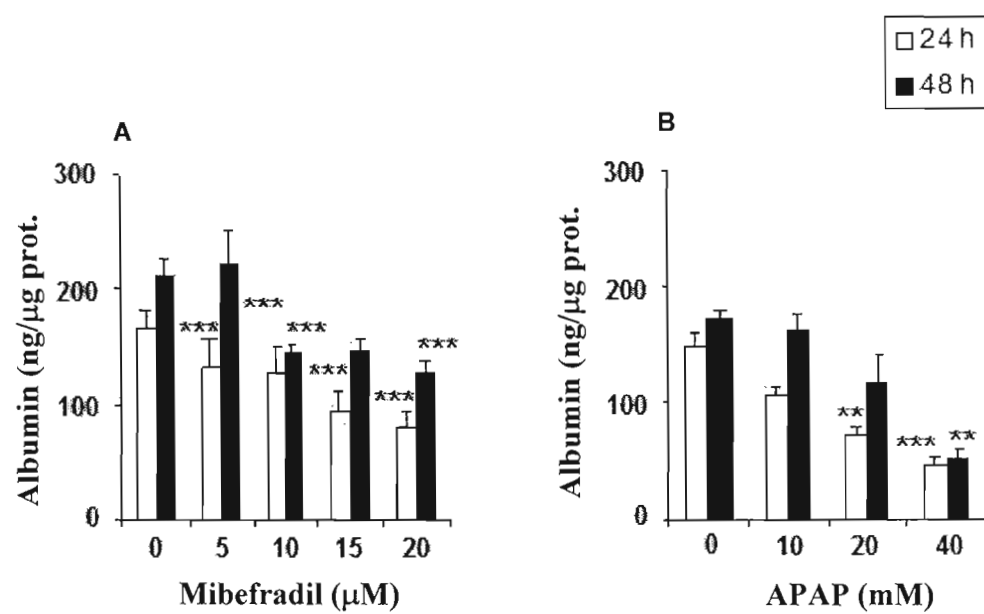


Fig. 9.3. Mibefradil and APAP inhibit albumin secretion in rat hepatocytes.

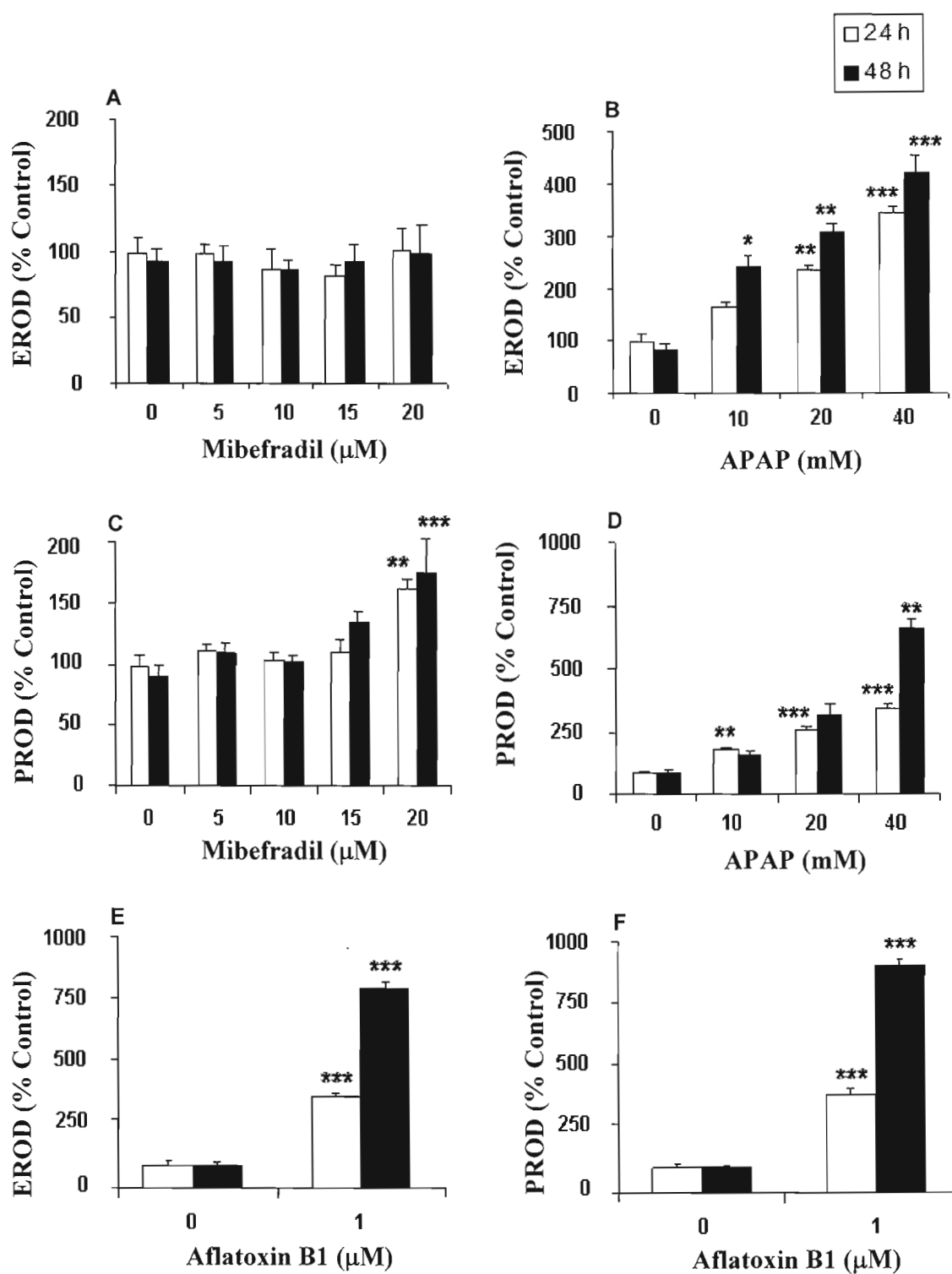


Fig. 9.4. Effects of mibefradil and APAP on CYP1A and CYP2B activities in rat hepatocytes.

Mibefradil

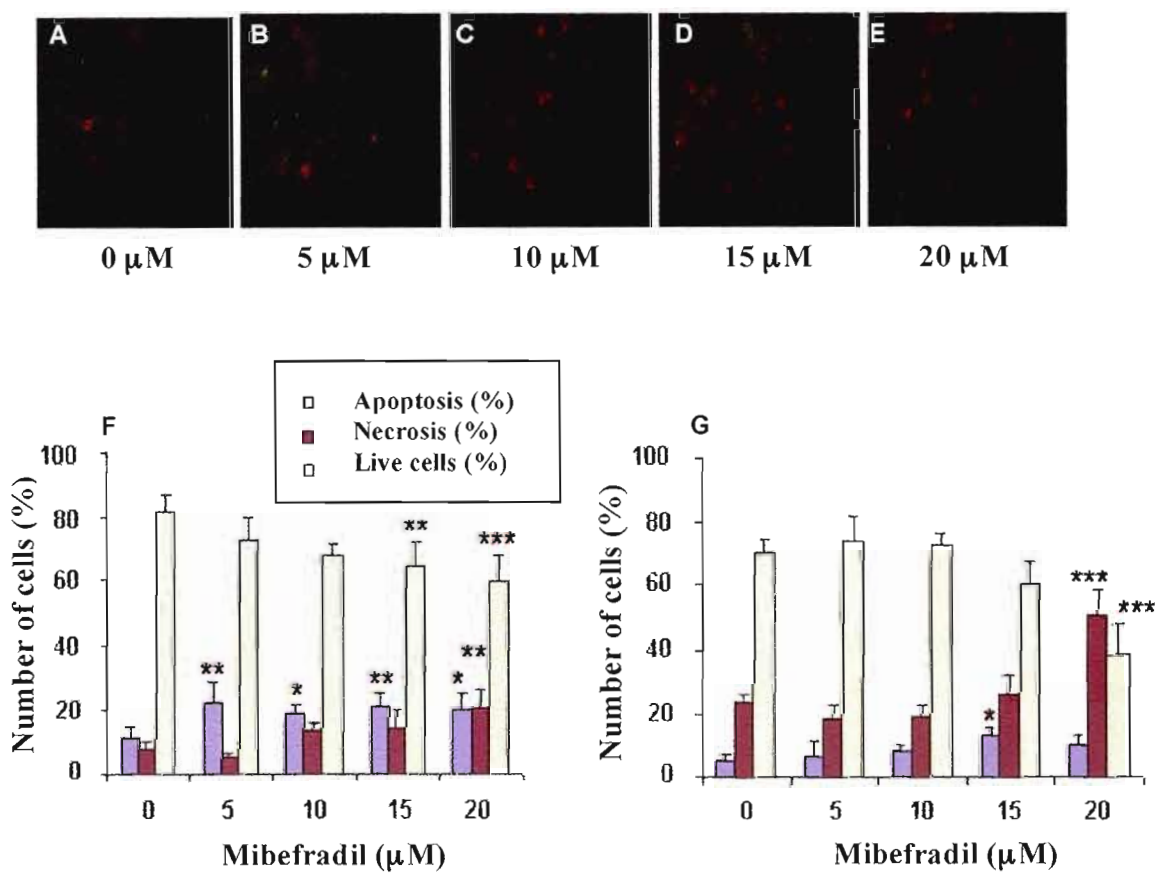


Fig. 9.5. Morphological analysis of apoptosis and necrosis in rat hepatocytes following exposure to mibefradil or APAP.

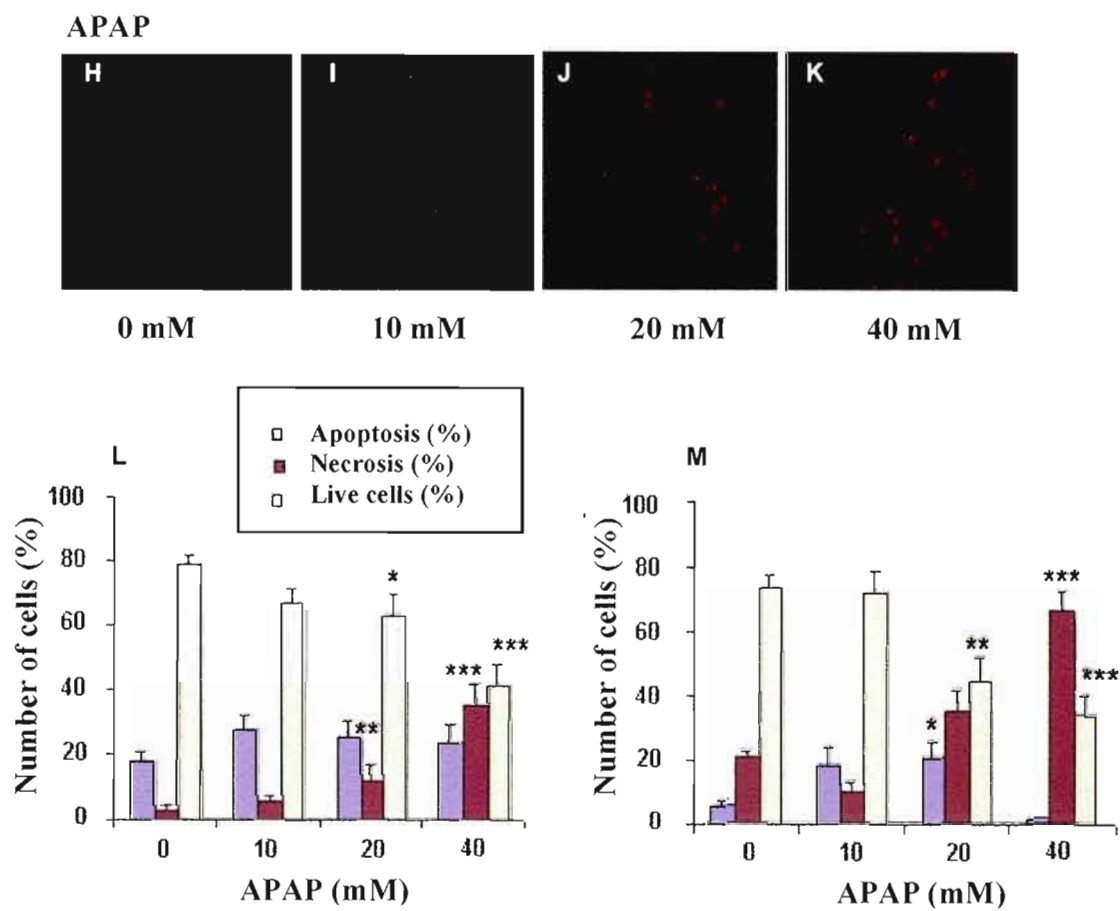


Fig. 9.5. Morphological analysis of apoptosis and necrosis in rat hepatocytes following exposure to mibefradil or APAP.

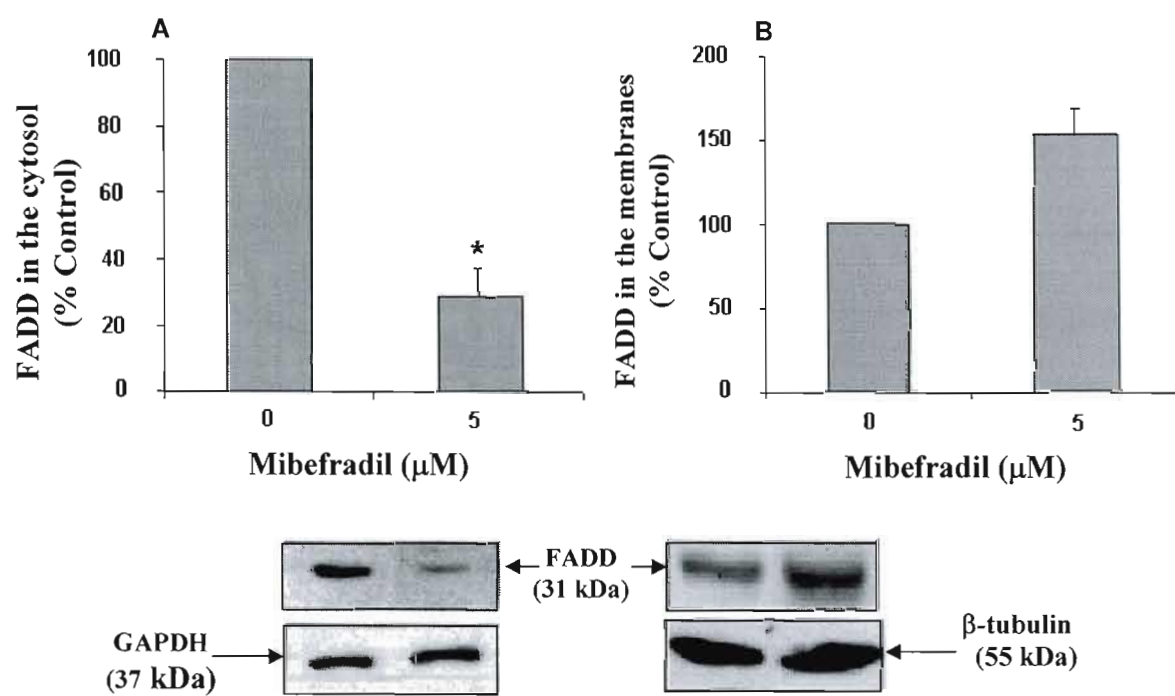


Fig. 9.6. Translocation of FADD from the cytosol to membranes induced by mibefradil and APAP in rat hepatocytes.

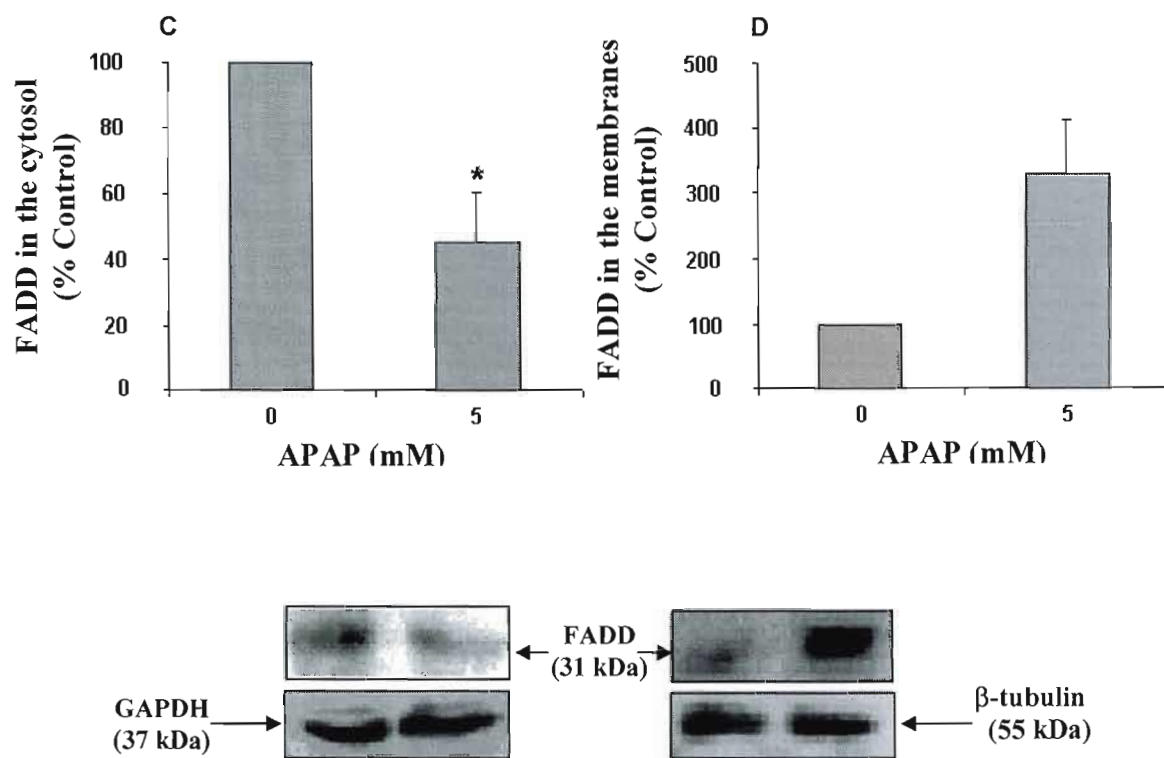


Fig. 9.6. Translocation of FADD from the cytosol to membranes induced by mibefradil and APAP in rat hepatocytes.

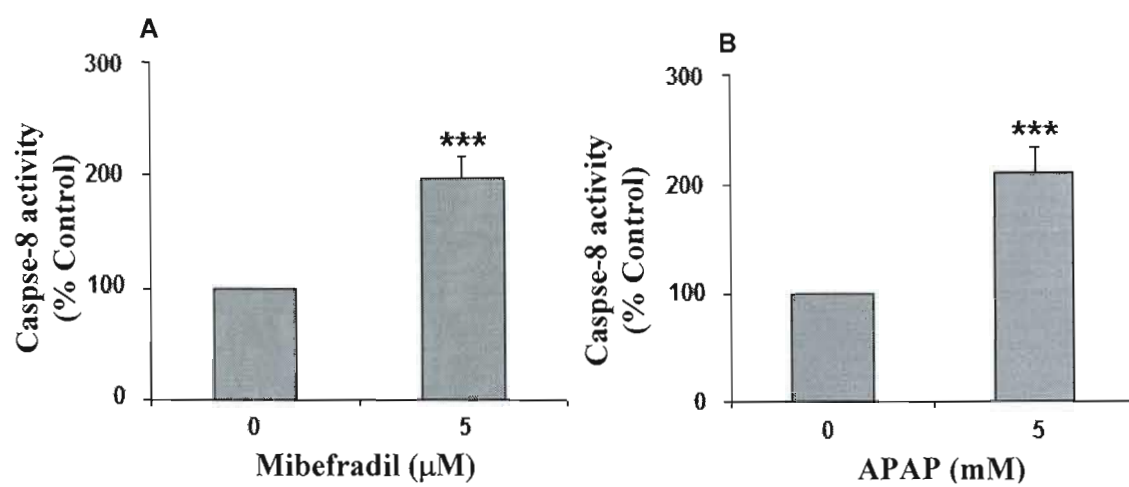


Fig. 9.7. Activation of initiator caspase-8 by mibefradil and APAP in rat hepatocytes.

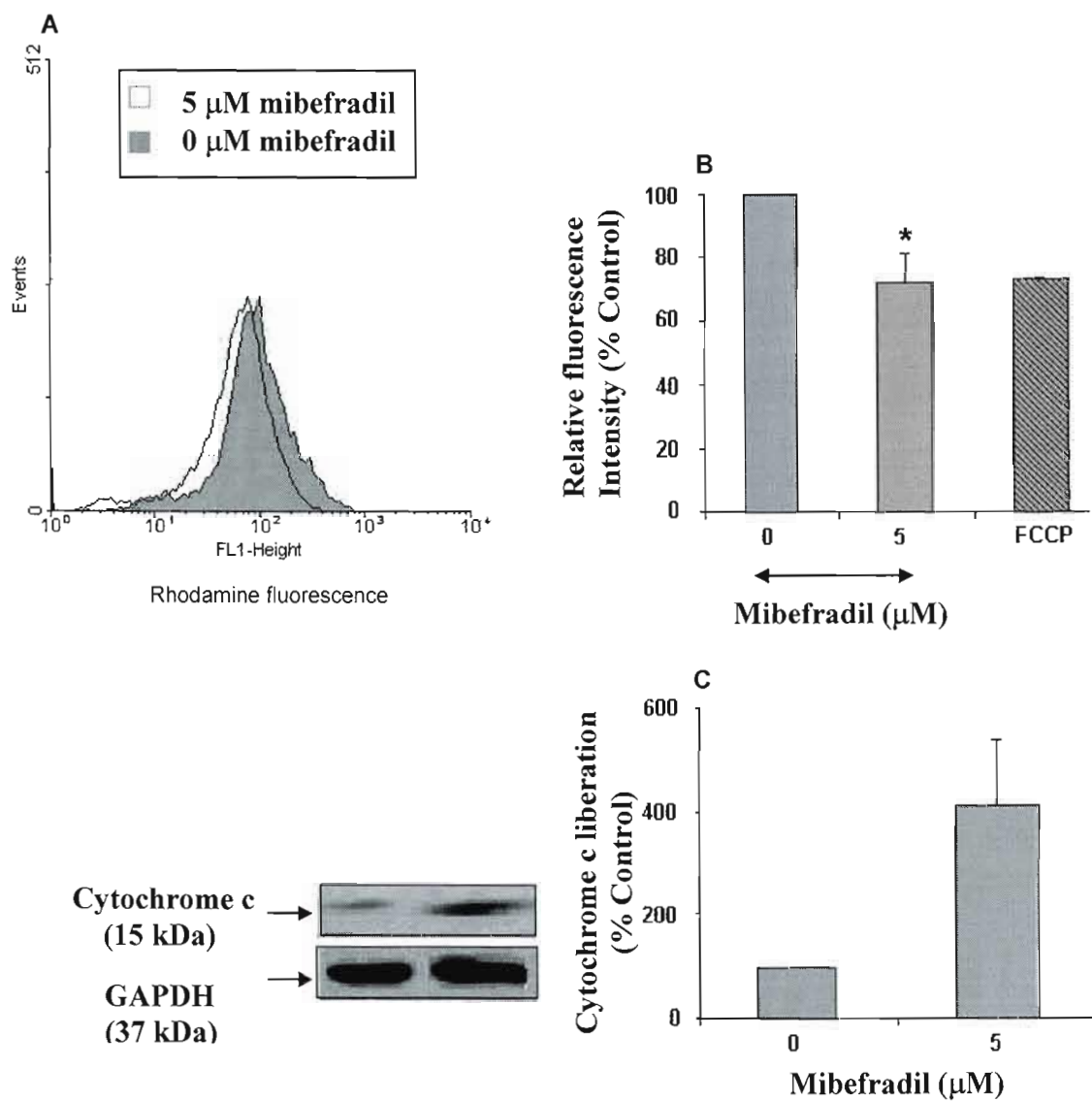


Fig. 9.8. Induction of $\Delta\Psi_m$ depolarization and liberation of cytochrome c by mibefradil and APAP in rat hepatocytes.

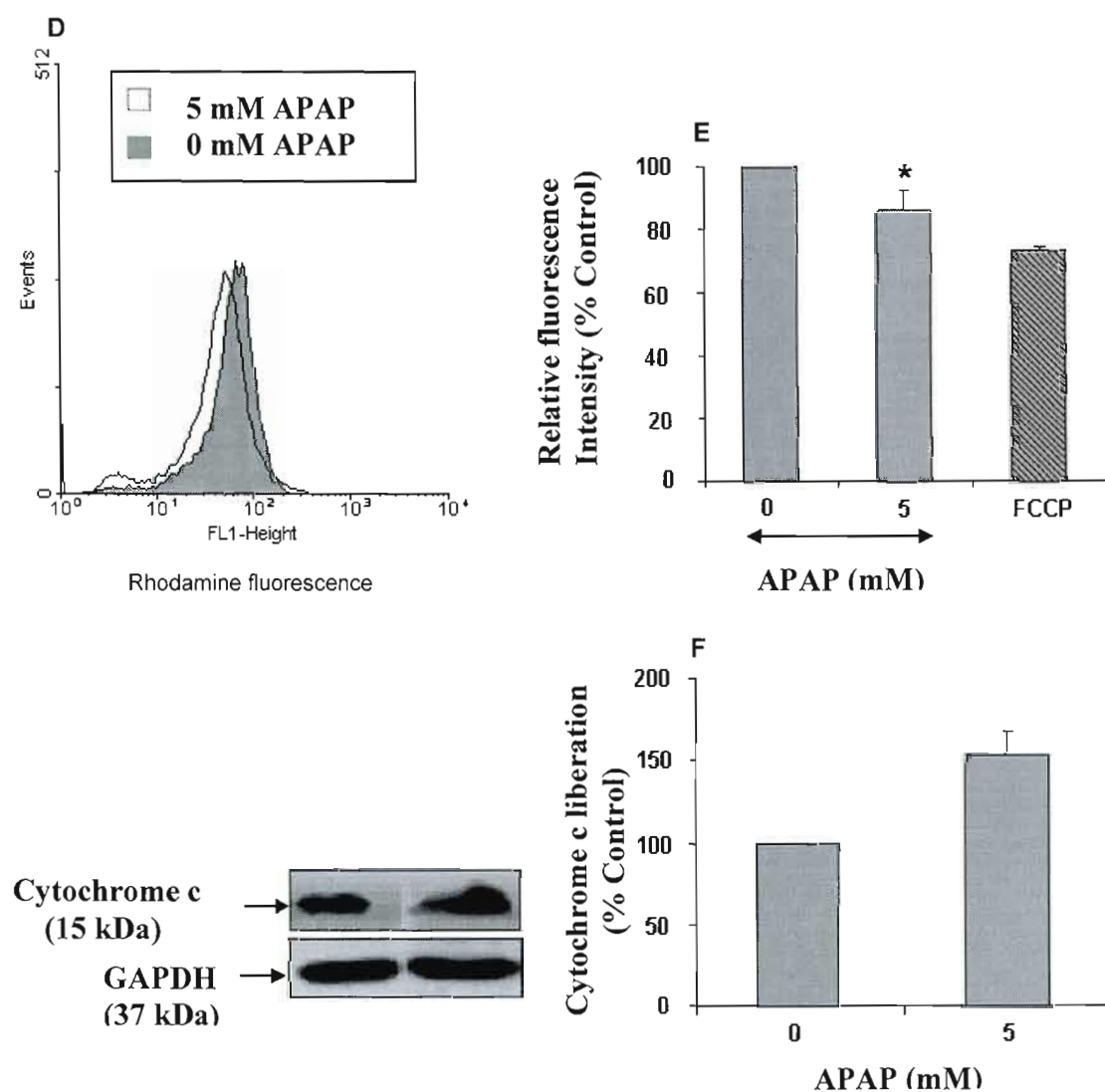


Fig. 9.8. Induction of $\Delta\Psi_m$ depolarization and liberation of cytochrome c by mibefradil and APAP in rat hepatocytes.

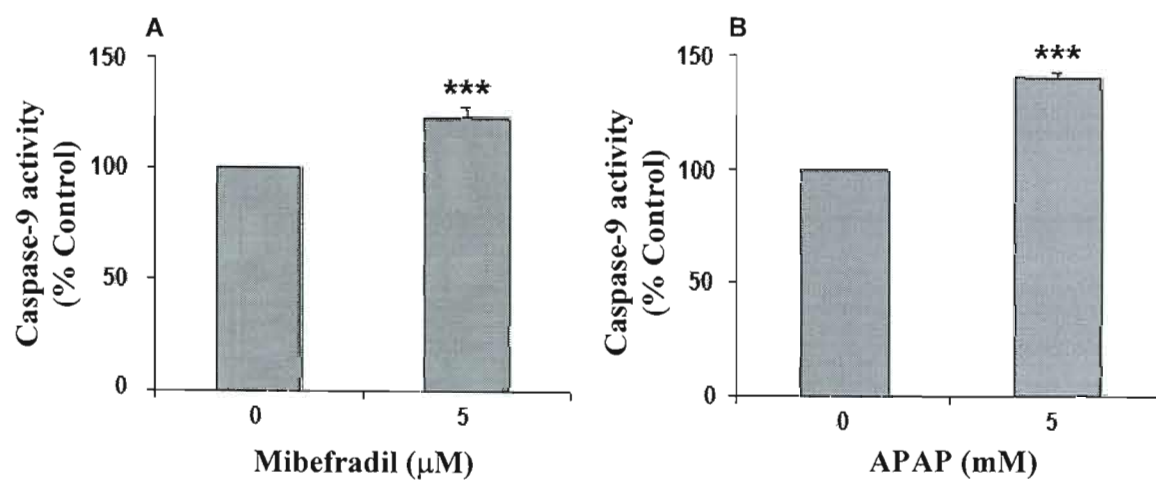


Fig. 9.9. Activation of initiator caspase-9 by mibefradil and APAP in rat hepatocytes.

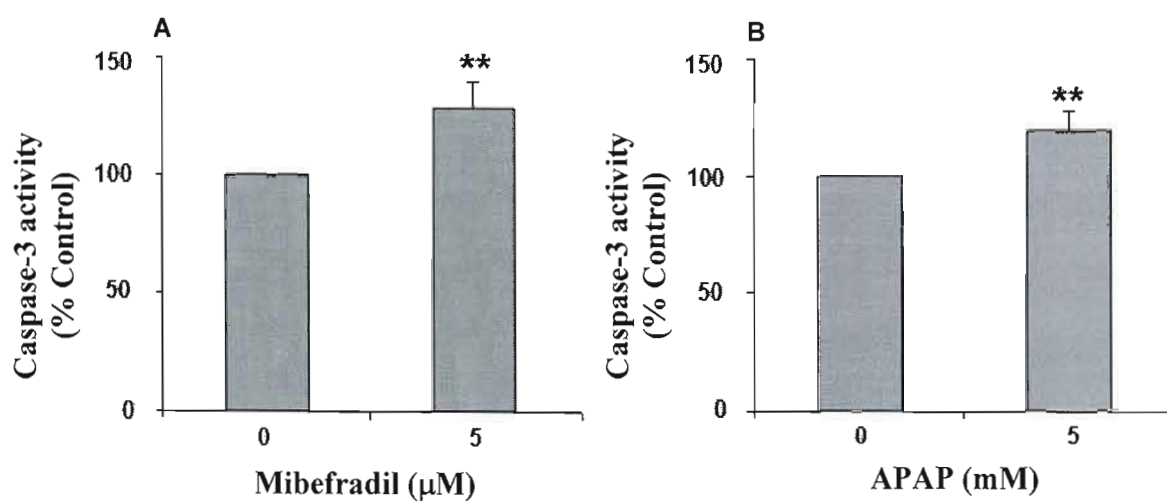


Fig. 9.10. Activation of executor caspase-3 by mibefradil and APAP in rat hepatocytes.

9.3 Induction de toxicité par le fongicide Mintezol^{MD} en culture primaire d'hépatocytes

Marilyne Séide¹, Michel Marion¹, Mircea Alexandru Mateescu¹ et Diana A. Averill-Bates^{2*}.

¹Département de chimie

²Département des sciences biologiques

Université du Québec à Montréal. C.P. 8888, Succursales Centre Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

*Auteur de correspondance

Plusieurs médicaments pharmacologiques disponibles sur le marché peuvent exercer des effets hépatotoxiques chez les humains et causer de nombreuses maladies hépatiques sévères, ce qui représente un sérieux problème de santé publique. Cette étude évalue l'hépatotoxicité, le métabolisme, de même que le mode et le mécanisme de mort cellulaire du médicament antihelminthique Mintezol^{MD} (thiabendazole) en culture primaire d'hépatocytes de rats. Le thiabendazole est également un pesticide employé comme fongicide en agriculture. Nous n'avons mesuré presque aucune hépatotoxicité avec le thiabendazole (100-500 µM), en employant des techniques classiques telles que la libération de la LDH et l'incorporation de PI. Cependant, le médicament a augmenté les activités de CYP1A et CYP2B, tel que déterminé par la mesure de l'activité du 7-éthoxyrésorufin-o-dééthylase (EROD) et du 7-pentoxyrésorufin-o-déalkylase (PROD), respectivement. De plus, il a induit l'apoptose dans les hépatocytes de rats, ce qui a été supporté par l'activation des caspases -3, -8 et -9, la diminution du potentiel membranaire mitochondrial, la libération du cytochrome c dans le cytosol, et la translocation de la protéine «Fas-associated death domain» du cytosol aux membranes. Ainsi, nos résultats démontrent que le thiabendazole induit l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose et de celle des récepteurs de mort. Un constat important s'avère que le thiabendazole cause l'hépatotoxicité et peut éliminer les cellules hépatiques par apoptose, qui est un marqueur plus sensible pour le dommage hépatique que les marqueurs de dommage nécrotique. Cette étude améliore notre compréhension du mécanisme d'hépatotoxicité du thiabendazole, ce qui est important afin de trouver des stratégies permettant de diminuer sa toxicité pour les humains en tant qu'agent pharmacologique, de même que pour d'autres espèces qui s'avèrent exposées à ce composé dans un contexte environnemental.

Sera soumis à : *Toxicology and Applied Pharmacology*

9.4 INDUCTION OF TOXICITY BY THE FUNGICIDE MINTEZOL™ IN PRIMARY CULTURES OF RAT HEPATOCYTES

Marilyne Séide^{1,2}, Michel Marion¹, Mircea Alexandru Mateescu¹ and Diana A. Averill-Bates^{2*}

¹Département de chimie, ²Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal

*Corresponding author:

Diana Averill: averill.diana@uqam.ca

Phone number: (514) 987-3000 (ext. 4811), fax: (514) 987-4647

Université du Québec à Montréal

Département des sciences biologiques

C.P.8888, succ Centre Ville

Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Keywords: thiabendazole; acetaminophen; apoptosis; necrosis; hepatocytes; hepatotoxicity; caspases; albumin.

Abbreviations : APAP, N-acetyl-para-aminophenol; H-33258, Hoechst 33258; PI, propidium iodide; CYP, cytochrome P450; EROD, ethoxyresorufin-o-deethylase; PROD, pentoxyresorufin-o-dealkylase; FADD, Fas-associated death domain; NAPQI, N-acetyl-para-benzoquinone-imine; LDH, lactate dehydrogenase; Rh-123, rhodamine 123; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; FCCP, carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; MTT, methyl tetrazolium; TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling.

9.4.1 Abstract

Many pharmaceutical drugs available in the market may exert hepatotoxic effects in humans and cause numerous severe liver diseases, which represents a serious public health issue. The present study investigates the hepatotoxicity, the metabolism, as well as the mode and the mechanism of cell death of the antihelmintic drug MintezolTM (thiabendazole) in primary cultures of rat hepatocytes. Thiabendazole is also a pesticide which is used as an antifungal agent in agriculture. With thiabendazole (100-500 μ M), almost no hepatotoxicity was measured by classical techniques such as LDH release and PI uptake. However, the drug increased CYP1A and CYP2B activities, as determined by the measurement of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and 7-pentoxoresorufin-O-dealkylase (PROD) activities, respectively. Moreover, it induced apoptosis in rat hepatocytes, which was supported by activation of caspases -3, -8 and -9, decrease of mitochondrial membrane potential, the release of cytochrome c into the cytosol and the translocation of the «Fas-associated death domain» protein from the cytosol to membranes. Thus, our results demonstrate that thiabendazole induces activation of the mitochondrial and the death receptor pathways of apoptosis. An important finding is that thiabendazole causes hepatotoxicity and can eliminate hepatic cells by apoptosis, which is a more sensitive marker for hepatic damage than markers for necrotic damage. This study improves understanding of the mechanism of hepatotoxicity of thiabendazole, which is important for finding strategies to decrease its toxicity to humans as a pharmaceutical agent as well as to other species which are exposed to this compound in an environmental context.

9.4.2 Introduction

The liver is the main site of metabolism of drugs and environmental pollutants, mostly by the cytochrome P450 isoenzymes, into more hydrophilic and less toxic compounds that can be easily eliminated from the organism (Meeks et al., 1991; Blake et al., 1995). Hepatocytes are the major cell type in the liver, and are responsible for most hepatospecific functions, such as the synthesis of the blood plasma proteins albumin and ceruloplasmin (Carter et Ho, 1994; Das et al., 2007). Thereby, primary cultures of hepatocytes represent a very useful model to study the metabolism and hepatotoxicity of pharmacological compounds and environmental pollutants (Bader et al., 2004; Shen et al., 2006). Hepatocytes contain intact metabolic capacities and may be considered a better experimental model than liver slices or perfused organs systems in which, however, cellular structure remains intact. Indeed, these latter systems are characterized by many disadvantages. For example, inadequate diffusion of oxygen and substrates, with a resulting necrosis, is often seen with the use of liver slices. As for perfused liver, its viability period is relatively short, and it is an expensive and technically complicated technique when compared to hepatocyte cultures (Smith et al., 1977).

Drug-induced hepatotoxicity constitutes a major public health issue in most Western countries since it accounts for the majority of cases of acute liver failure cases, which are often lethal (Keeffe, 2005). Hepatotoxicity is often associated with 2 main types of cell death: necrosis and apoptosis (Yin et Dong, 2003). Necrosis usually occurs following a major cellular insult (Krauss, 2001). It is a random process involving cell swelling, membrane disintegration and the release of cell contents, which results in inflammatory damage in surrounding cells and tissues (Kam et Ferch, 2000; Jaeschke et al., 2004; Kroemer et al., 2007). Apoptosis, however, is a physiologic mechanism observed in almost all pluricellular organisms in order to regulate development as well as cellular and tissular homeostasis (Schattenberg et al., 2006; Wang et al., 2005; Huerta et al., 2007). It is an active form of cell death that is finely regulated at the biochemical level by a number of intracellular proteins (Yin et Dong, 2003); in particular, the activation of the caspase (cysteine-aspartyl-protease) enzymes plays a major role in the initiation and execution phases of apoptosis (Mirkes, 2002;

Yin et Dong, 2003). These proteases are identified as initiator (caspases-2, -8, -9-, 10- and -12) and effector (caspases-3, -6 and -7) caspases (Martinon et al., 2002; Wang et al., 2005; Huerta et al., 2007). Moreover, during apoptosis, cells undergo many morphological changes such as cell shrinkage and the formation of membrane-bound apoptotic bodies (Zornig et al., 2001; Jaeshke et al., 2004). However, the membrane is not disintegrated as occurs during necrosis, and the apoptotic bodies are phagocytosed by neighbouring cells and macrophages in order to avoid inflammation (Wang et al., 2005; Shattenberg et al., 2006).

Two major apoptotic pathways have been well characterized: the death receptor pathway and the mitochondrial pathway (Kroemer et al., 2007). In the mitochondrial pathway, cellular stress like DNA damage, UV radiation, heat shock, growth factor privation, environmental toxins, or treatment with neoplastic agents triggers the collapse of the mitochondrial membrane potential and the liberation of the apoptogenic molecule cytochrome c into the cytosol (Wang et al., 2005; Huerta et al., 2007; Kroemer et al., 2007). Following its release, cytochrome c binds to the apoptosis protease activating factor-1 (APAF-1) protein, in the presence of dATP. Together, cytochrome c, APAF-1, dATP and procaspase-9 form a high molecular weight complex (apoptosome) that promotes activation of caspase-9. Initiator caspase-9 then activates downstream effector caspases such as caspases-3 and -7 (Yin et Dong, 2003; Wang et al., 2005; Kroemer et al., 2007). The death receptor pathway involves membrane receptors like Fas and the tumor necrosis factor (TNF) (Yin et Dong, 2003). Upon ligand binding, the receptor will trimerize and recruit an adaptor protein such as the Fas-associated death domain (FADD), which translocates from the cytosol to membranes (Hengartner, 2000; Mirkes, 2002; Yin et Dong, 2003). FADD will, in its turn, recruit procaspase-8 to form the death inducing signaling complex (DISC) along with Fas receptor; at the DISC, caspase-8 is activated and subsequently activates effector caspases like caspase-3 (Wang et al., 2005).

Thiabendazole is a broad-spectrum antihelminthic used to treat worm infestations in animals and humans and also serves as a post-harvest fungicide in the fruits and vegetables industry (Coulet et al., 2000; Horne et al., 2003; Dalvie et al., 2006). The maximum

recommended dose for thiabendazole is 3 g/day (i.e.: 3.17 mM/day, considering that the average volume of blood in an adult is 4.7 L) per day in humans or a single dose of 50 mg/kg of body weight (Oleksy, 2001; Food and Drug Administration, 2003), and the drug is generally considered to be safe (Mizutani et al., 1994). Nevertheless, cases of severe intrahepatic cholestasis often progressing to micronodular cirrhosis have been reported (Roy et al., 1989; Mohi-ud-din and Lewis, 2004). However, parenchymal liver damage caused by thiabendazole has rarely led to irreversible hepatic failure (Food and Drug Administration, 2003). In addition, studies in human have reported peak plasma concentrations of 1 to 6 $\mu\text{g/ml}$ (5 to 30 μM) thiabendazole and 5 to 10 $\mu\text{g/ml}$ of the metabolite 5-hydroxythiabendazole, one hour after intake of an oral dose of 1 g of radiolabeled [^{14}C] thiabendazole (Tocco et al., 1996; European Medicines Agency, 2004).

Furthermore, thiabendazole is mainly metabolized by CYP1A2 (Coulet et al., 1998; 2000; Dalvie et al., 2006) and is a known inducer of CYP1A1/2 (Rey-Grobellet et al., 1996; Delescluse et al., 2001; Lemaire et al., 2004; Price et al., 2004) and CYP2B1/2 (Price et al., 2004). As for many other pesticides, agricultural use of thiabendazole will lead to accumulation of this compound in the environment and the potential of causing toxicity in a variety of species.

However, the molecular mechanisms of thiabendazole-induced cell death have not yet been determined. The aim of the present study is to better understand the mechanism of action of thiabendazole by investigating, in primary cultures of rat hepatocytes, the metabolism and the hepatotoxicity of this drug, including the mode and the mechanism of cell death it induces.

9.4.3 Materials and Methods

Materials

Minimal essential medium (MEM), modified Leibovitz-15 (L-15) (inspired from Crabb and Li, 1985), gentamicin and trypsin-EDTA were purchased from Gibco/Life Technologies (Burlington, Ontario, CAN). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Immunocorp (Montreal, Québec, CAN) and dithiothreitol (DTT) was purchased from ICN Pharmaceuticals Canada Ltd (Montreal, Québec, CAN). William's medium E (WME), insulin, thiabendazole, aflatoxin B1, carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), protease inhibitor cocktail, H-33258 and anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody were all purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri, USA). N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (Temed), acrylamide, protein molecular weight standards and protein assay dye reagent concentrate were obtained from Bio-Rad (Mississauga, Ontario, CAN). Ethoxyresorufin (EROD) and pentoxyresorufin (PROD) fluorescent substrates as well as rhodamine 123 were obtained from Molecular probes Inc. (Eugene, Oregon, USA). The fluorescent substrates Ac-Asp-Glu-Val-Asp-(7-amino-4-methylcoumarin) (Ac-DEVD-AMC) for caspase-3, Z-Ile-Glu-Thr-Asp-(7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) (Z-IETD-AFC) for caspase-8 and Ac-Leu-Glu-His-Asp-(7-amino-4-trifluoro-methylcoumarin) (Ac-LEHD-AFC) for caspase-9 as well as propidium iodide (PI) were purchased from Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, California, USA). Percoll and sheep anti-mouse IgG HRP-linked antibody were obtained from GE Healthcare (Baie d'Urfée, Québec, CAN). Goat anti-rat IgG antibody for albumin detection was purchased from Nordic (Homeby, Ontario, CAN) and antibody to rat albumin conjugated to HRP was obtained from Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, Texas, USA). Mouse monoclonal anti-cytochrome c (clone 7H8-2C12) antibody was obtained from BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA) whereas rabbit anti-Fas-associating protein with death domain (FADD) polyclonal antibody was purchased from Stressgen Bioreagents (Victoria, British Columbia, CAN). Anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (6C5: sc-32233) and anti-tubulin antibody (D-10: sc-5274) were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, California, USA).

Methods

Preparation of primary cultures of rat hepatocytes and treatment with drugs

Hepatocytes from male Sprague Dawley rats (150-250 g) were isolated by a two-step perfusion technique (Seglen, 1976).⁶⁷ Animals were maintained and handled in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines (CCAC, Guide vol. 1, 2nd edition, 1993). Rat hepatocytes were purified by isodensity Percoll centrifugation and cell viability was measured using flow cytometry with 20 µg/ml of PI. Cell viability usually ranged between 80% and 95%. Either 340 000 or 2.8 millions of freshly isolated hepatocytes were suspended in WME containing 10% FBS and 0.5% gentamicin and were seeded respectively in 35 or 100 mm Petri dishes coated with type I collagen obtained from rat tail tendon. Cells were allowed to attach for 2 h at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂, then washed with MEM to remove dead and unattached cells. Thereafter, 2.5 ml (for 35 mm culture dishes) or 12.2 ml (for 100 mm culture dishes) of fresh L-15 medium supplemented with 0.2 µg/ml of insulin and 0.5% gentamicin were added to each Petri dish. Subsequently, hepatocytes were incubated with or without thiabendazole (100-500 µM) or aflatoxin B1 (1 µM) at 37°C for periods of times ranging from 1 to 48 h. Thiabendazole and aflatoxin B1 were dissolved in dimethyl sulfoxide. The concentration range used for thiabendazole is explained by the fact that this compound could not be dissolved in dimethyl sulfoxide above 500 µM.

Assessment of hepatocyte viability

Following drug treatment, hepatocyte membrane integrity was assessed by the determination of lactate dehydrogenase (LDH) activity in the media according to Moldeus et al. (1978). The release of LDH into the medium was quantified after 24 and 48 h following removal of the culture medium. To determine percentage of viability, total LDH release was assessed in live cells that were lysed using Triton X-100.

Assessment of changes in hepatocyte morphology

Changes in hepatocyte morphology, relative to untreated controls, were evaluated in cells that had been exposed to thiabendazole for 24 and 48 h, using an optical microscope (Nikon model TMS-F, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (Camera Coolpix E 5000 with MDC lens, Nikon, Tokyo, Japan).

Determination of albumin secretion

Following drug treatment for 24 and 48 h, albumin secretion from hepatocytes was quantified for in samples of medium by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA technique) according to Uotila et al. (1981), with minor modifications. Goat anti-rat IgG antibody and anti-rabbit IgG HRP-linked antibody were used for detection of albumin. Protein concentration was determined in the supernatants using the Bradford assay (Bradford, 1976).

Determination of activity of cytochrome P450 isoenzymes CYP1A and CYP2B

After 24 and 48 h of exposure to drugs, hepatocytes (340 000 cells/ Petri dish) were incubated with 8 μ M ethoxyresorufin (EROD) (for CYP1A1) or 17 μ M pentoxyresorufin (PROD) (for CYP2B) for 1 h at 37°C. Thereafter, 600 μ l of supernatant were collected from each sample and ethanol was added for a final volume of 1 ml. After a 10-minute centrifugation at 14 000x g to solubilize resorufin products, the resorufin formed was measured fluorimetrically at wavelengths of 530 nm (excitation) and 585 nm (emission) (Gupta et al., 1994). Aflatoxin B1 (1 μ M) was used as a positive control for the induction of both CYP1A and CYP2B. Protein concentration was determined in the supernatants (Bradford, 1976).

Morphological analysis of apoptosis and necrosis

Condensation of nuclear chromatin was visualized using H-33258 staining. This fluorescent dye complexes with condensed DNA and thereby stains apoptotic cells by blue-green fluorescence. Cells (340 000/Petri dish), that had or had not been exposed to thiabendazole for 24 or 48 h, were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with H-33258 (16 $\mu\text{g/ml}$) for 15 min in the dark. The dishes were washed again with PBS, and PI (16 $\mu\text{g/ml}$) was added just before visualization of cells by fluorescence microscopy (Carl Zeiss Ltd, Montreal, Quebec, CAN). PI is a red fluorescent probe that binds DNA and is actively excluded by apoptotic and living cells but not by necrotic cells. Photographs were taken using a digital camera (Camera 3CDD, Sony DXC-950P, Empix Imaging Inc, Mississauga, Ontario, CAN) and images were analysed by Northern Eclipse software. The fractions of apoptotic and necrotic cells were determined relative to total cells. At least 100 cells were counted per dish.

Flow cytometry analysis of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$)

$\Delta\Psi\text{m}$ was measured using the fluorescent probe rhodamine 123 (Rh-123). Hepatocytes (2.8 million cells), that had been exposed or not to thiabendazole for 1 h, were washed twice with PBS. The cells were resuspended with L-15 and then incubated with Rh-123 (600 ng/ml) for 5 min in the dark at room temperature. For positive controls, hepatocytes were incubated with FCCP (5 μM) for 25 min prior to incubation with Rh-123. Samples were washed again once and cells were detached using trypsin-EDTA supplemented with 0.2% PBS/bovine serum albumin (BSA). Each sample was centrifuged for 2 min at low speed at room temperature. Then, supernatants were removed and pellets were resuspended in L-15. PI (20 $\mu\text{g/ml}$) was added to cell suspensions stained with Rh-123, to identify necrotic cells. Cells were analysed with a FACScan flow cytometer equipped with an argon laser emitting at 488 nm (Becton Dickinson, Oxford, UK). Acquisition and analysis of data was performed

using Lysis II software (Becton Dickson). Photomultiplier settings were adjusted to detect Rh-123 fluorescence on the FL1 detector and PI fluorescence on the FL2 detector. For each sample, the mean fluorescence intensity of 10,000 live cells in FL1 was analyzed. Apoptotic cells undergo a decrease in mitochondrial membrane potential, thus incorporating less of the Rh-123 dye. Therefore, they emit less fluorescence on the FL1 detector.

Enzymatic assays of caspase activities

2.8 million hepatocytes, treated or not with either thiabendazole for 1 h, were washed twice with PBS, and 30 μ l of homogenisation buffer (20 mM HEPES, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, pH 7.4) freshly supplemented with 2 mM DTT was added. Lysats were homogenized manually with a hand potter (Kontes glass CO, Duall @22, Fisher, Quebec, CAN), and protein concentration was determined in the supernatants (Bradford, 1976). Caspase assays were carried out using 100 μ g of proteins in each microplate with homogenisation buffer. The microplate was incubated for 10 min at 37°C, and then the appropriate substrate was added. Assays for caspases-3, -8 and -9 were performed using the substrates Ac-DEVD-AMC (50 μ M), Z-IETD-AFC (100 μ M) and Ac-LEHD-AFC (100 μ M), respectively (Nicholson et al., 1995). Caspase activity was evaluated by monitoring the cleavage of substrates over a period of 30 minutes. Corresponding slopes were obtained at appropriate wavelengths of excitation (λ_{Ex}) and emission (λ_{Em}): λ_{Ex} of 400 nm and λ_{Em} of 505 nm for AFC release and λ_{Ex} of 380 nm and λ_{Em} of 460 nm for AMC release. A SpectraMax Gemini Spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) was used and the slopes were obtained by SOFTmax Pro software (Molecular Devices).

Subcellular fractionation and immunodetection of cytochrome c and FADD

A minimum of 2.8 million cells for immunodetection of cytochrome c and 5.6 million cells for immunodetection of FADD were washed with PBS, and homogenisation buffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA) freshly supplemented with protease inhibitors ([4-(2-aminoethyl)-benzensulfonyl fluoride] (AEBSF), pepstatin, trans-epoxysuccinyl-L-

leucylamido (4-guanido)butane (E-64), bestatin, leupeptin, aprotinin) and 0.3% β -mercaptoethanol was added. Lysates were homogenised using a hand potter (Kontes glass CO, Duall @22, Fisher, Quebec, CAN) and were centrifuged at 280x g during 10 min at 4 °C. Supernatants were then centrifuged for 1 h at 100 000x g at 4°C to isolate the cytosolic fraction (supernatant) from the membrane fraction (pellet). The cytosolic fraction was used for detection of both cytochrome c and FADD while the membrane fraction was used to detect FADD.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of cellular proteins was performed according to Laemmli (1970). For each sample, 40 μ g of proteins were solubilised in Laemmli's sample buffer and heated at 100°C, and loaded onto a 12% (FADD) or 15% (cytochrome c) polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 130 V for 1.5 h. Following transfer of cellular proteins to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a semi-dry blotting apparatus (Millipore, Seattle, USA), non-specific sites were blocked under mild agitation, either overnight at 4°C for cytochrome c or for 1 h at room temperature for FADD, in Tris-buffered saline with Tween buffer (TBS+T) (2 mM Tris, 13.7 mM NaCl, and 0.1% Tween, pH 7.4) containing 5% (w/v) powdered skim milk. Membranes were then washed 4 times for 15 min with TBS+T and the primary antibody was added either overnight at 4°C (anti-FADD 1:4000) or for 1 h at room temperature (anti-cytochrome c 1:1000, anti-GAPDH 1:5000 and anti-tubulin 1:1000). After that, PVDF membranes were washed again and incubated for 1 h at room temperature with the appropriate secondary antibodies (goat anti-rabbit IgG for FADD and anti-mouse IgG for cytochrome c, tubulin and GAPDH) conjugated to horseradish peroxidase (HRP). Membranes were washed 4 times for 15 min and proteins were detected by chemiluminescence (HyGLO™ Chemiluminescent HRP antibody reagent, Denville Scientific Inc, Metuchen, NJ). To verify the equivalence in protein loading, the blots were probed with the anti-GAPDH antibody for the cytosolic fractions and the anti-tubulin antibody for the membrane fractions and by coloration of the membranes using Coomassie blue. Protein expression was quantified by densitometry, relative to appropriate loading controls, using a Molecular Dynamics (Sunnyvale, California, USA) scanner equipped with analytical software IP lab gel and ChemImager.

Statistical analysis

All experiments were performed at least three times with cells isolated from different animals. All data are reported as means \pm S.E.M. For determination of albumin secretion, apoptosis, necrosis, LDH release, CYP1A and CYP2B activity, statistical differences between thiabendazole-treated and untreated cells were determined using a one-way ANOVA followed by Dunnet bilateral adjustment. For analysis of membrane potential, caspases-3, -8 and -9, FADD and cytochrome c, statistical differences between control and treated groups were determined by a Student's bilateral t test.

9.4.4 Results

Thiabendazole causes a decrease in cell viability of rat hepatocytes

Induction of cytotoxicity by thiabendazole was assessed by measuring basal LDH release from primary cultures of hepatocytes. LDH release from cells represents a common biomarker of cell death, and indicates severe membrane damage. When hepatocytes were exposed to micromolar (100-500 μM) concentrations of thiabendazole for 24 and 48 h, no significant changes in cell viability were observed, compared with untreated controls. Indeed, cell viability was stable at around 90% at 24 h, and 81% to 83% at 48 h (Fig. 9.11).

Subsequently, morphology was analyzed in thiabendazole-treated hepatocytes by optical microscopy. Treatment of rat hepatocytes with 100-500 μM of thiabendazole over 24 and 48 h did not significantly alter the phenotype of rat hepatocytes (Fig. 9.12).

The effect of thiabendazole on albumin secretion in primary cultures of rat hepatocytes

Albumin secretion, which is a typical hepatospecific function of differentiated hepatocytes, was assessed in order to evaluate the effects of thiabendazole on the metabolic activity of rat hepatocytes. When hepatocytes were exposed to thiabendazole (100-500 μM), a tendency for a slight decrease in albumin synthesis was observed (Fig. 9.13).

Thiabendazole and APAP induce activities of CYP1A and CYP2B

CYP1A and CYP2B metabolize, and are known to be induced, by a variety of xenobiotics in rat hepatocytes (Ortiz de Montellano, 1995; Madan et al., 1999). Dose-dependent induction of CYP1A activity in primary cultures of rat hepatocytes was seen after exposure to thiabendazole (100-500 μM) (Fig. 9.14 A) over 24 and 48 h, as determined by measurement of EROD activity. CYP2B activity was also induced by thiabendazole (Fig. 9.14 B), as shown by an increase in PROD activity. Aflatoxin B1 (1 μM) was used as a

positive control for induction of CYP1A and CYP2B activities (Fig. 9.14 C and D). The level of induction of CYP1A and CYP2B activities by thiabendazole was relatively small compared to induction by aflatoxin B1.

Thiabendazole causes cell death by apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes

Subsequently, the type of cell death (i.e., apoptosis or necrosis) induced by thiabendazole was investigated in primary cultures of rat hepatocytes. Morphological assessment of apoptosis was analyzed by the condensation of nuclear chromatin using the fluorescent probe H-33258 (blue-green) whereas necrosis was revealed by the fluorescent probe PI (red). Thiabendazole (Fig. 9.15 A-G) induced apoptosis. Exposure to thiabendazole for 24 h led to a concentration-dependent increase in apoptosis (Fig. 9.15 F). There were no dose-dependent variations in necrosis after 24 and 48 h of exposure to thiabendazole (100-500 μ M) (Fig. 9.15 F and G). Nevertheless, no changes in apoptosis were observed after 48 h of exposure to thiabendazole, compared to control cells (Fig. 9.15 G).

Activation of the death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis by thiabendazole

The following step was to explore the activation of the death receptor and mitochondrial apoptotic signaling pathways by thiabendazole. The death receptor pathway involves the translocation of FADD from the cytosol to membranes and activation of initiator caspase-8. The mitochondrial pathway involves a decrease in $\Delta\Psi_m$, release of cytochrome c from mitochondria into the cytosol, and activation of initiator caspase-9. Activation of the receptor pathway of apoptosis was confirmed by the translocation of adaptor protein FADD from the cytosol to membranes, following exposure of rat hepatocytes to thiabendazole (200 μ M, 1 h) (Fig. 9.16 A,B). Optimal time of exposure to thiabendazole for induction of caspase-8 activity in hepatocyte cultures was determined by a kinetic study over 24 h (data not shown). Exposure of hepatocytes to 200 μ M thiabendazole for 1 h (Fig. 9.17) caused a 1.8-fold increase in caspase-8 activity, relative to untreated control cells.

Activation of the mitochondrial pathway by thiabendazole was confirmed by its ability to trigger $\Delta\Psi_m$ collapse and the liberation of cytochrome c into the cytosol. Exposure of cells to 200 μM thiabendazole for 1 h (Fig. 9.18 A,B) led to a decrease in Rh-123 fluorescence, relative to control hepatocytes. Furthermore, exposure of rat hepatocytes to 200 μM thiabendazole for 1 h caused the release of cytochrome c from mitochondria into the cytosol (Fig. 9.18 C). Optimal time of exposure to thiabendazole for induction of caspase-9 activity in hepatocyte cultures were determined by a kinetic study over 24 h (data not shown). Caspase-9 activity increased after 1 h when cells were exposed to 200 μM thiabendazole (1.3-fold increase) (Fig. 9.19), compared with untreated controls.

Activation of the execution phase of apoptosis by thiabendazole

Caspase-3 is the main executioner of apoptosis, generally playing a crucial role in the dismantlement of cells undergoing this mode of cell death. Optimal time of exposure to thiabendazole for induction of caspase-3 activity in hepatocyte cultures were determined by a kinetic study over 24 h (data not shown). Following exposure of rat hepatocytes to thiabendazole (200 μM , 1 h), there was a 2-fold increase in caspase-3 activity, relative to untreated controls (Fig. 9.20).

9.4.5 Discussion

In the present study, we used primary cultures of rat hepatocytes in order to investigate the metabolism and the hepatotoxicity of thiabendazole and get more insights about the mode of cell death this drug might trigger. First, we found that when hepatocytes were exposed to thiabendazole (100-500 μM) over 24 and 48 h, no changes in cell viability were observed, as determined by LDH release. This lack of toxicity is in agreement with several reports that found this drug to be devoid of cytotoxic effect, even at higher doses. For example, Sugihara et al. (1997) reported that exposure of primary cultures of rat hepatocytes to 500 μM thiabendazole for 10 h only led to a 10% decrease in cell viability, as measured by LDH leakage. Also, Lemaire et al. (2004) showed, using the methyl tetrazolium test (MTT), that thiabendazole did not exert any cytotoxicity in isolated rat hepatocytes at dose ranges from 10 to 250 μM after 72 h of exposure. Rey-Grobellet (1996) found that at 24 h, LDH release did not increase, relative to controls, when hepatocytes were exposed to 200 μM thiabendazole. Moreover, Nakagawa and Moore (1995) reported that a 3-h exposure of rat hepatocytes to 750 μM thiabendazole led to a 10% decrease in cell viability, relative to control hepatocytes. Finally, Aix et al. (1994) found unchanged values of LDH leakage (9-10%) in primary cultures of rabbit hepatocytes at doses of thiabendazole ranging from 30 to 200 μM , after 24 h of treatment.

The absence of cytotoxicity of thiabendazole in rat hepatocytes was confirmed with morphological observations by optical microscopy and by detection of necrosis by PI uptake. Indeed, no morphological changes and changes in necrosis were seen after exposure to thiabendazole. No data on the evaluation of necrosis in hepatic cells exposed to thiabendazole has yet been published.

The subsequent assessment of hepatocyte metabolism showed only a minor decrease in albumin synthesis when cells were exposed to thiabendazole over 24 and 48 h. Our study is the first to report results of measurements of albumin synthesis by hepatocytes treated with

thiabendazole.

It is important to know the effects of drugs on all CYP450 isoforms, especially the major ones involved in metabolism (ex.: CYP1A, CYP2B, CYP3A), since this knowledge may help prevent adverse drug interactions. Thiabendazole induced CYP1A1/2 and CYP2B1/2 activities in rat hepatocyte cultures. Thiabendazole has been shown to induce CYP1A1/2 activity in studies with cultured rat (Lemaire et al., 2004) and rabbit (Aix et al., 1994) hepatocytes, and with microsomal preparations from rabbits (Rey-Grobellet, 1996). Although some studies with rabbit hepatocytes (Aix et al., 1994) and microsomal preparations from rabbits (Rey-Grobellet et al., 1996) indicated no activation of CYP2B by thiabendazole, Price et al. (2004) measured a dose-dependent increase in PROD activity of up to 617% compared with controls, in microsomal fractions of rats that were fed diets containing high doses (2016-5188 ppm) of thiabendazole for 28 days.

An important finding is that the present study demonstrates for the first time, that thiabendazole is capable of inducing cell death by apoptosis in rat hepatocytes. Since no hepatotoxicity was detected by LDH release, PI staining or morphological observations, this clearly shows that markers of apoptosis are much more sensitive for detection of cellular damage to hepatocytes. The induction of apoptosis was confirmed morphologically by the condensation of nuclear chromatin, a later event in the apoptotic cascade, after 24 h of exposure to 250 and 500 μ M thiabendazole. However, the present article may be the first showing hepatotoxicity of thiabendazole, due to the evaluation of markers of apoptosis.

Moreover, our results show that thiabendazole induces both the mitochondrial and death receptor pathways of apoptosis in cultured rat hepatocytes. The induction of the mitochondrial pathway was confirmed by a decrease in $\Delta\Psi_m$, followed by the liberation of cytochrome c from mitochondria into the cytosol, after 1 h of exposure to thiabendazole. The present article is the first to show a depolarization of the $\Delta\Psi_m$ and/or a release of mitochondrial cytochrome c triggered by thiabendazole in hepatic cells.

In the mitochondrial pathway of apoptosis, the release of cytochrome c leads to the processing of procaspase-9 to form active caspase-9. Indeed, in our study, thiabendazole (200 μ M) induced the activation of initiator caspase-9 after 1 h. These results demonstrate for the first time an induction by thiabendazole of the activity of initiator caspase-9 in hepatic cells.

The death receptor pathway of apoptosis involves membrane receptors like Fas (Yin et Dong, 2003) that are activated upon ligand binding and recruit an adaptor protein such as FADD. FADD then relocates from the cytosol to membranes (Hengartner, 2000; Mirkes, 2002; Yin et Dong, 2003) and recruits in turn procaspase-8 to form the death inducing signaling complex (DISC) along with Fas receptor; at the DISC, initiator caspase-8 becomes activated (Wang et al., 2005). Indeed, our study showed for the first time that thiabendazole (200 μ M, 1 h) induced the translocation of FADD into membranes and the activation of caspase-8.

Both the mitochondrial and the death receptor pathways converge on the activation of the main effector caspase-3 (Kon et al., 2004). We are the first to show that thiabendazole (200 μ M, 1 h) activates caspase-3.

In conclusion, the present study is the first to provide an assessment of the effect of thiabendazole on hepatocytes metabolism, and a detailed investigation of the mode and the mechanism of cell death induced by this compound. Our results show that micromolar doses (100 to 500 μ M) of thiabendazole did not cause necrosis or morphological changes in hepatocytes, or decreases in viability and albumin synthesis. However, 200 μ M thiabendazole induced cell death by apoptosis, which was induced through both the receptor and the mitochondrial pathways. Induction of apoptosis was manifested by activation of caspases-3, -8 and -9 and decrease in $\Delta\Psi_m$, and by mobilization of cytochrome c from mitochondria to cytosol and of FADD from the cytosol to membranes. An important finding is that thiabendazole causes hepatotoxicity and can eliminate hepatic cells by apoptosis, which is a more sensitive biomarker for hepatic damage than classical markers for necrotic damage. The doses of thiabendazole (100 to 500 μ M) used in this study are higher than the peak plasma concentrations (5 to 30 μ M) detected in humans, but lower than the recommended maximum

daily dose (3g/day or 3.17 mM). However, hepatocyte cultures were exposed to the drug for relatively short times (24 to 48 h), whereas humans are exposed to lower doses for prolonged periods of time. Since humans and other species are exposed to this compound in both pharmaceutical and environmental contexts, these findings could be useful for discovering ways to prevent toxicity of this compound.

9.4.6 Acknowledgements

Financial support was obtained from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) INNOV, Gestion Valeo, and Valorisation Recherche Quebec (VRQ). The authors thank Mr. Bertrand Fournier (SCAD, UQÀM), who performed the statistical analyses.

9.4.7 References

- Aix, L., Rey-Grobellet, X., Larrieu, G., Lesca, P., Galtier P., 1994. 'Thiabendazole is an inducer of cytochrome P4501A1 in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 483-489.
- Bader, A., Knop, E., Boker, K.H., Crome, O., Fruhauf, N., Gonschior, A.K., Christians, U., Esselmann, H., Pichlmayr, R., Serwing, K.F., 2004. Tacrolimus (FK506) biotransformation in primary rat hepatocytes depends on extracellular matrix geometry. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 353, 461-473.
- Blake ,B.L., Rose, R.L., Mailman, R.B., Levi, P.E., Hodgson, E., 1995. Metabolism of thioridazine by microsomal monooxygenases : relative roles of P450 and flavin-containing monooxygenase. *Xenobiotica* 25:, 377-393.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72, 248-254.
- Carter, D.C., Ho, J.X., 1994. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 45, 153-203.
- Coulet, M., Dacasto, M., Eeckhoutte, C., Larrieu, G., Sutra, J.F., Alvinerie, M., Mace, K., Pfeifer, A.M., Galtier, P., 1998. Identification of human and rabbit cytochromes P450 1A2 as major isoforms involved in thiabendazole 5-hydroxylation. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 12, 225-235.
- Coulet, M., Eeckhoutte, C., Larrieu, G., Sutra, J.F., Alvinerie, M., Mace, K., Pfeifer A.M.A., Zucco, F., Stamatii, A. L., De Angelis, I., Vignoli A.L., Galtier P., 2000. Evidence for cytochrome P4501A2 mediated protein covalent binding of thiabendazole and for its passive intestinal transport: use of human and rabbit derived cells. *Chem. Biol. Interact.* 127, 109-124.
- Dalvie, D., Smith, E., Deese, A., Bowlin, S., 2006. In vitro metabolic activation of thiabendazole via 5-hydroxythiabendazole: identification of a glutathione conjugate of 5-hydroxythiabendazole. *Drug Metab. Dispos.* 34, 709-717.
- Delescluse, C., Ledirac, N., Li, R., Piechocki, M.P., Hines, R.N., Gidrol, X., Rahmani, R., 2001. Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. *Biochem. Pharmacol.* 61, 339-407.
- European Medicines Agency, Veterinay Medicines and Inspections-Committee for medicinal products for veterinary use. 2004. "Thiabendazole (extrapolation to goats). Summary report (3)", <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/086803en.pdf>, (January 13, 2008).

Food and Drug Administration. 2003. "Chewable tablets and suspension. Mintezol® (Thiabendazole) ", http://www.fda.gov/medwatch/safety/2003/03Jun_PI/Mintezol_PI.pdf, (March 20th, 2007).

Gupta, S., Rajvanshi, P., Sokhi, R., Vaidya, S., Irani, A.N., Gorla, G.R., 1999. Position-specific gene expression in the liver lobule is directed by the microenvironment and not by the previous cell differentiation state. *J. Biol. Chem.* 274, 2157-2165.

Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Horne, E., Coyle, T., O'Keeffe, M., Alvinerie, M., Galtier, P., Brandon, D.L., 2003. Release of protein-bound residues of thiabendazole from liver. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 5552-5555.

Huerta, S., Goulet, E.J., Huerta-Yepez, S., Livingston, E.D., 2007. Screening and detection of apoptosis. *J. Surg. Res.* 139, 143-156.

Jaeschke, H., Gujral, J S., Bajt, M.L., 2004. Apoptosis and necrosis in liver disease. *Liver Int.* 24, 85-89.

Kam, P.C.A., Ferch, N.I., 2000. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 55, 1081-1093.

Keeffe, E.B., 2005. Acute liver failure. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 70, 56-62.

Krauss, G., 2001. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 3 rd. Wiley-VCH, Weinheim.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99-163.

Laemmli, U.K. , 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-885.

Lemaire ,G., Delescluse, C., Pralavorio, M., Ledirac, N., Lesca, P., Rahmani, R, 2004. The role of protein tyrosine kinases in CYP1A1 induction by omeprazole and thiabendazole in rat hepatocytes. *Life Sci*, 74, 2265-2278.

Madan, A., Dettaan, R., Midra, D., Carroll, K., LeCluyse, E., Parkinson, A., 1999. Effect of cryopreservation on cytochrome P-450 enzyme induction in cultured rat hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 27, 327-335.

Martinon, F., Burns K., Tschopp, J., 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL-beta. *Mol. Cell.* 10, 417-426.

Meeks, R.G, Harrison, S.D., Bull, R.J., 1991. *Hepatotoxicology*. CRC Press, Boca Raton.

- Mirkes, P.E., 2002. Warkany lecture : To die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development. *Teratology* 65, 228-239.
- Mizutani, T., Ito, K., Nomura, H., Nakanishi, K., 1990. Nephrotoxicity of thiabendazole in mice depleted of glutathione by treatment with DL-buthionine sulfoximine. *Food Chem. Toxicol.* 28, 169-177.
- Mohi-ud-din, R., Lewis, J.H., 2004. Drug- and chemical-induced cholestasis. *Clin. Liver Dis.* 8, 95-132.
- Moldeus, P., Hogberf, J., Orrenius, S., 1978. Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol* 52, 60-71.
- Nakagawa, Y., Moore, G.A., 1995. Cytotoxic effects of postharvest fungicides, ortho-phenylphenol, thiabendazole and imazalil, on isolated rat hepatocytes. *Life Sci* 57, 1433-40.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, T.T., Yu, V.L., Miller, D.K., 1995. Identification and inhibition of ICE/Ced-3 proteases necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 76, 37-43.
- Olesky WG (2001) *The Circulatory system*. The Rosen Publishing Group, New York.
- Ortiz de Montellano, P.R., 1995. Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry, 2nd edition. Plenum Press, New York.
- Price, R.J., Scott, M.P., Walters, D.G., Stierum, R.H., Groten, J.P., Meredith, C., Lake, B.G., 2004. Effect of thiabendazole on some rat hepatic xenobiotic metabolizing enzymes. *Food Chem. Toxicol.* 42, 899-908.
- Rey-Grobellet, X., Eeckhoutte, C., Sutra, J.F., Alvinerie, M., Galtier, P., 1996. Major involvement of rabbit liver cytochrome P4501A in thiabendazole 5-hydroxylation. *Xenobiotica* 26, 765-778.
- Roy, M.A., Nugent, F.W., Aretz, H.T., 1989. Micronodular cirrhosis after thiabendazole. *Dig. Dis. Sci* 938-941.
- Schattenberg, J.M., Galle, P.R., Schuchmann, M., 2006. Apoptosis in liver disease. *Liver Int.* 26, 904-911.
- Seglen, P.O., 1976. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell. Biol.* 13, 29-83.
- Smith, R.V., Acosta, D., Rosazza, J.P., 1977. Cellular and microbial models in the investigation of mammalian metabolism of xenobiotics. *Adv. Biochem. Eng.* 5, 69-100.

Sugihara, N., Shimomichi, K., Furuno, K., 1997. Cytotoxicity of food preservatives in cultured rat hepatocytes loaded with linolenic acid. *Toxicology* 120, 29-36.

Tocco, D.J., Rosenblum, C., Martin, C.M., Robinson, H.J., 1966. Absorption, metabolism, and excretion of thiabendazole in man and laboratory animals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 9, 31-39.

Uotila, M., Ruolahti, E., Engwall, E., 1981. Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein. *J. Immunol. Methods* 42, 11-15.

Wang, Z.B., Liu, Y.Q., Cui, Y.F., 2005. Pathways to caspase activation. *Cell. Biol. Int.* 29, 489-496.

Zornig, M., Hueber, A.O., Baum, W., Evan, G., 2001. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1551, F1-F37.

9.4.8 Figure legends

Figure 9.11: Decreased viability of rat hepatocytes exposed to increasing concentrations of thiabendazole. Hepatocytes (340 000 cells) were incubated with 100-500 μM of thiabendazole for 24 and 48 h at 37 °C. Hepatocyte viability was assessed as a measure of LDH release in the media. Control cells were cultured without drugs. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 separate experiments performed in hepatocytes prepared from 3 different rats. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples.

Figure 9.12: Effects of thiabendazole on rat hepatocyte morphology. Hepatocytes (340 000 cells) were incubated with 200-500 μM of thiabendazole for 24 or 48 h at 37 °C. Representative photographs are shown from 3 independent experiments. Magnification: 320x.

Figure 9.13: Thiabendazole has a minor effect on albumin secretion in rat hepatocytes. Albumin secretion by hepatocytes (340 000 cells) was quantified by an ELISA assay after 24 and 48 h of incubation with 100-500 μM of thiabendazole at 37 °C. Control cells were cultured without drugs. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 independent experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples.

Figure 9.14: Effect of increasing concentrations of thiabendazole on CYP1A and CYP2B activities in rat hepatocytes. (A,B) Hepatocytes (340 000 cells) were incubated with 100-500 μM of thiabendazole for 24 and 48 h at 37 °C. CYP1A and CYP1B activities were determined as measures of EROD and PROD activities, respectively. (A-D) Control cells were cultured without drugs. (C,D) Aflatoxin B1 (1 μM) was used as a positive control. The results at each drug concentration are presented relative to the initial EROD or PROD activity assessed just after initiating hepatocyte cultures. Error bars represent means S.E.M. from 4 independent experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**) or $P<0.001$ (***) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.15: Morphological analysis of apoptosis and necrosis in rat hepatocytes following exposure to thiabendazole. Cells (340 000/Petri dish) were incubated with (A) 0, (B) 100, (C) 200, (D) 250 and (E) 500 μM of thiabendazole, for 48 h at 37 °C. Control cells were cultured without drugs. Hepatocytes were stained with H-33258 and PI and visualized by fluorescence microscopy (magnification 320 x). The fraction of apoptotic and necrotic cells following exposure to thiabendazole for (F) 24 h and (G) 48 h are given relative to total cells. A minimum of 100 cells were counted per dish. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 independent experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P<0.05$ (*) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.16: Translocation of FADD from the cytosol to membranes induced by thiabendazole in rat hepatocytes. (A, B) Hepatocytes (2.8×10^6 cells) were incubated with thiabendazole (200 μM , 1 h). The immunodetection of FADD was carried out by SDS-PAGE, using GAPDH (for cytosolic fractions) and β -tubulin (for membrane fractions) as loading controls. The expression of FADD is presented relative to untreated control cells. Error bars represent means \pm S.E.M. from 4 independent experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P<0.05$ (*) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.17: Activation of initiator caspase-8 by thiabendazole in rat hepatocytes. Hepatocytes (2.8×10^6 cells) were incubated with thiabendazole (200 μ M, 1 h). Enzymatic activity of caspase-8 is expressed relative to the activity obtained for untreated control cells. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 different experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P < 0.001$ (***) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.18: Induction of $\Delta\Psi_m$ depolarization and liberation of cytochrome c by thiabendazole in rat hepatocytes. (A) Hepatocytes (2.8×10^6 cells) were incubated with (A) 200 μ M thiabendazole for 1 h for 1 h at 37°C. (B) Fluorescence intensity is presented relative to untreated control cells. FCCP (5 μ M) was used as a positive control for membrane depolarisation. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 independent experiments. (C) Hepatocytes were incubated with thiabendazole (200 μ M, 1 h) and immunodetection of cytochrome c was carried out, using GAPDH as a loading control. The expression of cytochrome c is presented relative to untreated control cells. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 independent experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P < 0.01$ (**) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.19: Activation of initiator caspase-9 by thiabendazole in rat hepatocytes. Hepatocytes (2.8×10^6 cells) were incubated with thiabendazole (200 μ M, 1 h). Enzymatic activity of caspase-9 is expressed relative to the activity obtained for untreated control cells. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 independent experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P < 0.001$ (***) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

Figure 9.20: Activation of executor caspase-3 by thiabendazole in rat hepatocytes. Hepatocytes (2.8×10^6 cells) were incubated with thiabendazole (200 μ M, 1 h). Enzymatic activity of caspase-3 is expressed relative to the activity obtained for untreated control cells. Error bars represent means \pm S.E.M. from 3 independent experiments. For each experiment, the results for individual concentrations were obtained from 6 different samples. $P < 0.001$ (***) indicates a statistically significant difference between treated and untreated cells.

9.4.9 Figures

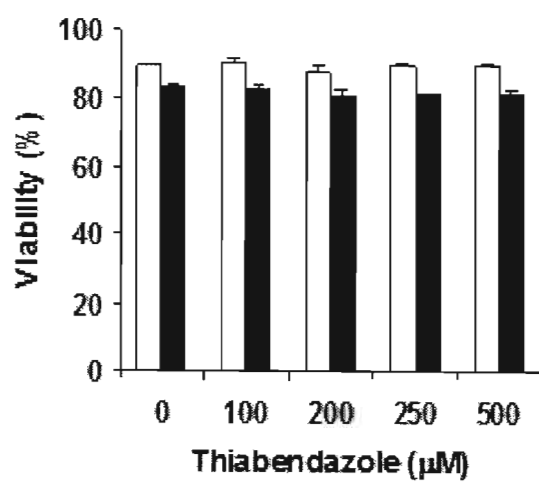


Fig. 9.11. Decreased viability of rat hepatocytes exposed to increasing concentrations of thiabendazole.

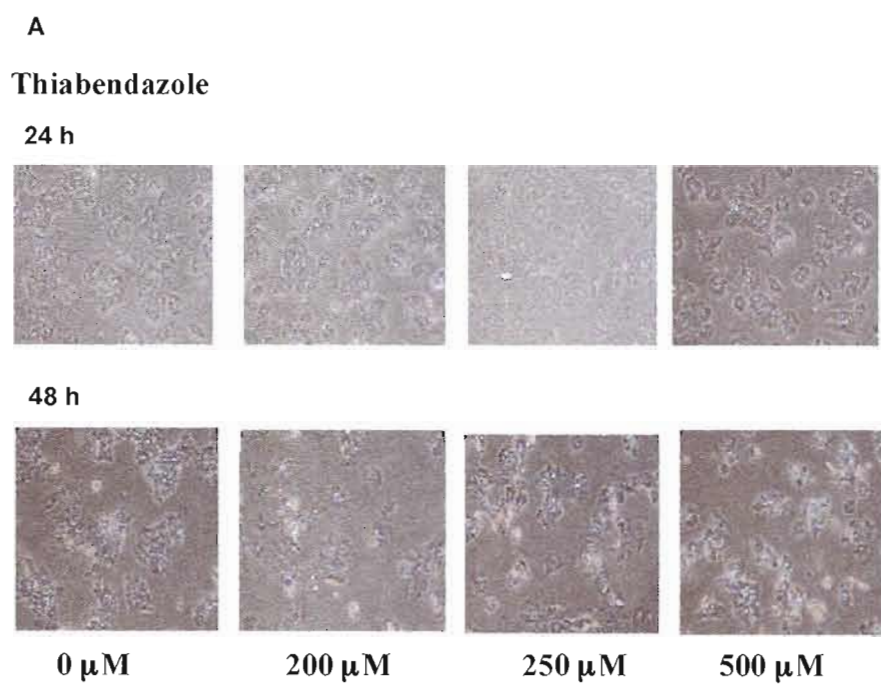


Fig. 9.12. Effects of thiabendazole on rat hepatocyte morphology.

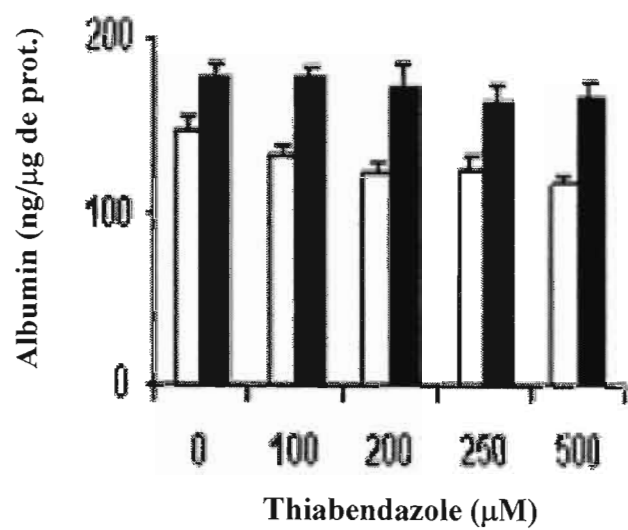


Fig. 9.13. Thiabendazole has a minor effect on albumin secretion in rat hepatocytes.

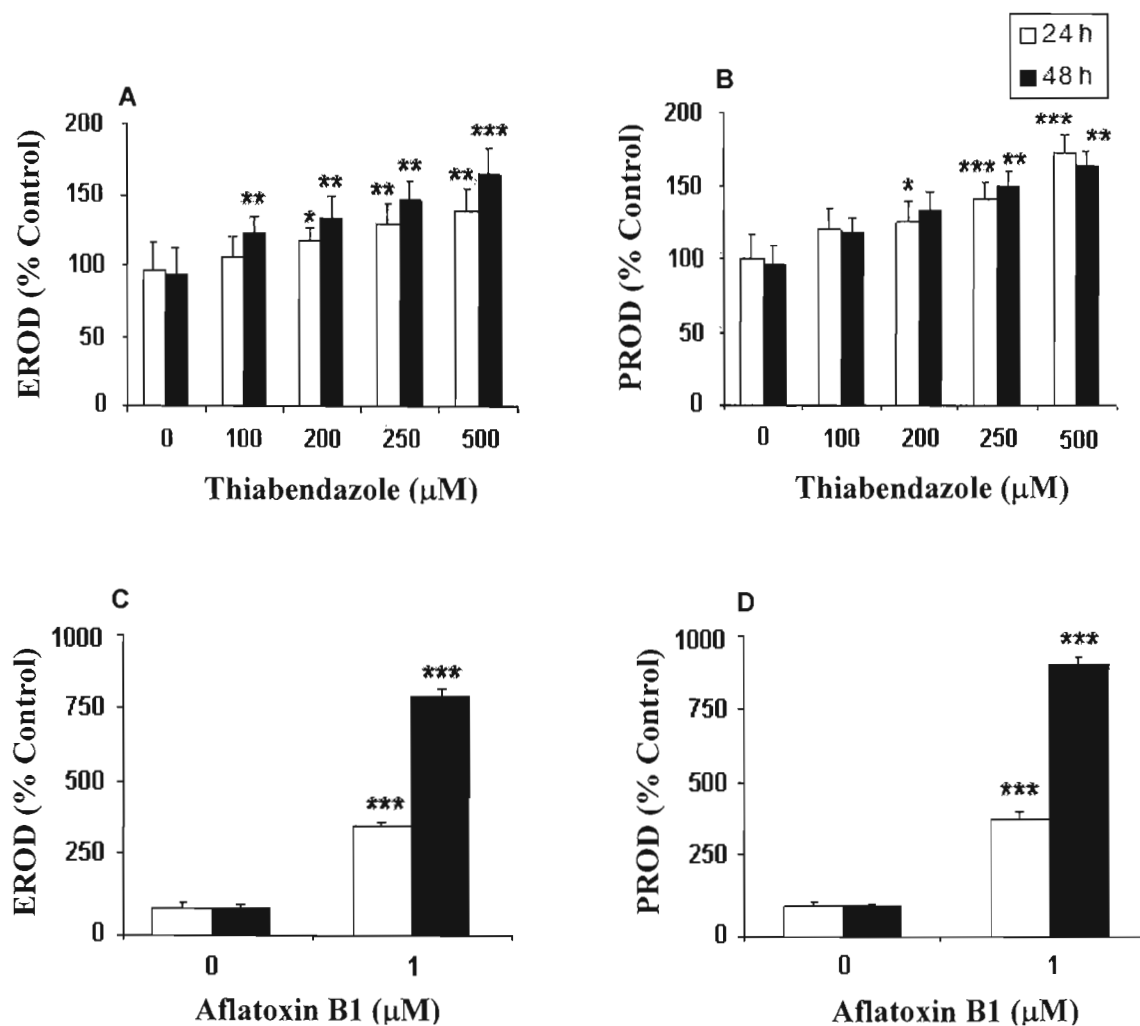


Fig. 9.14. Effect of increasing concentrations of thiabendazole on CYP1A and CYP2B activities in rat hepatocytes

Thiabendazole

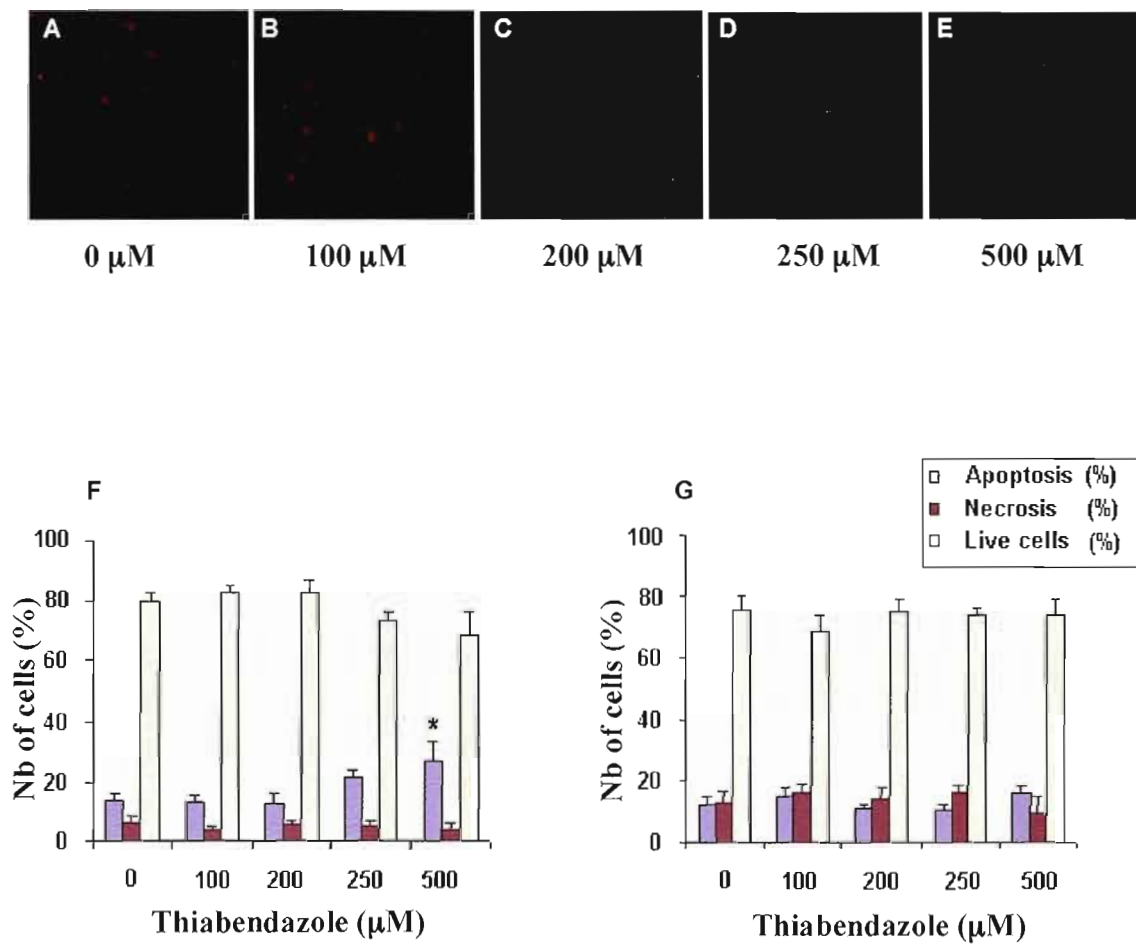


Fig. 9.15. Morphological analysis of apoptosis and necrosis in rat hepatocytes following exposure to thiabendazole

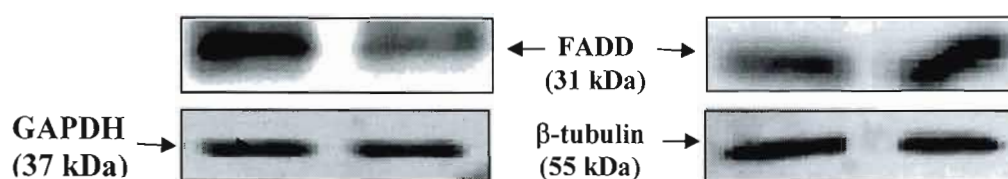
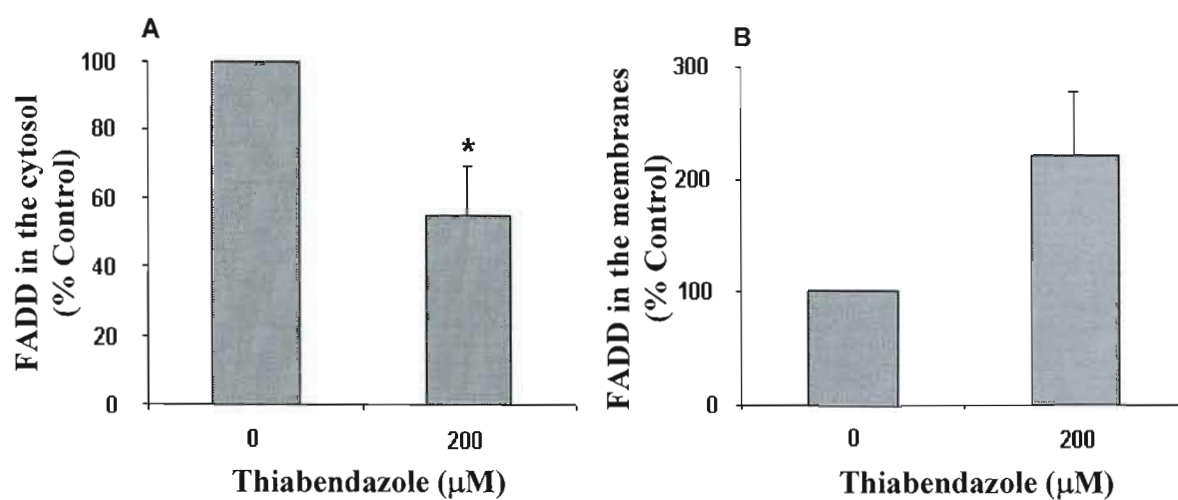


Fig. 9.16. Translocation of FADD from the cytosol to membranes induced by thiabendazole in rat hepatocytes.

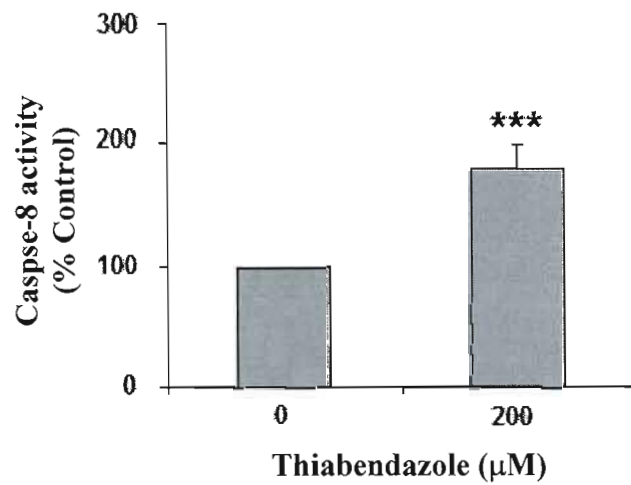


Fig. 9.17. Activation of initiator caspase-8 by thiabendazole in rat hepatocytes.

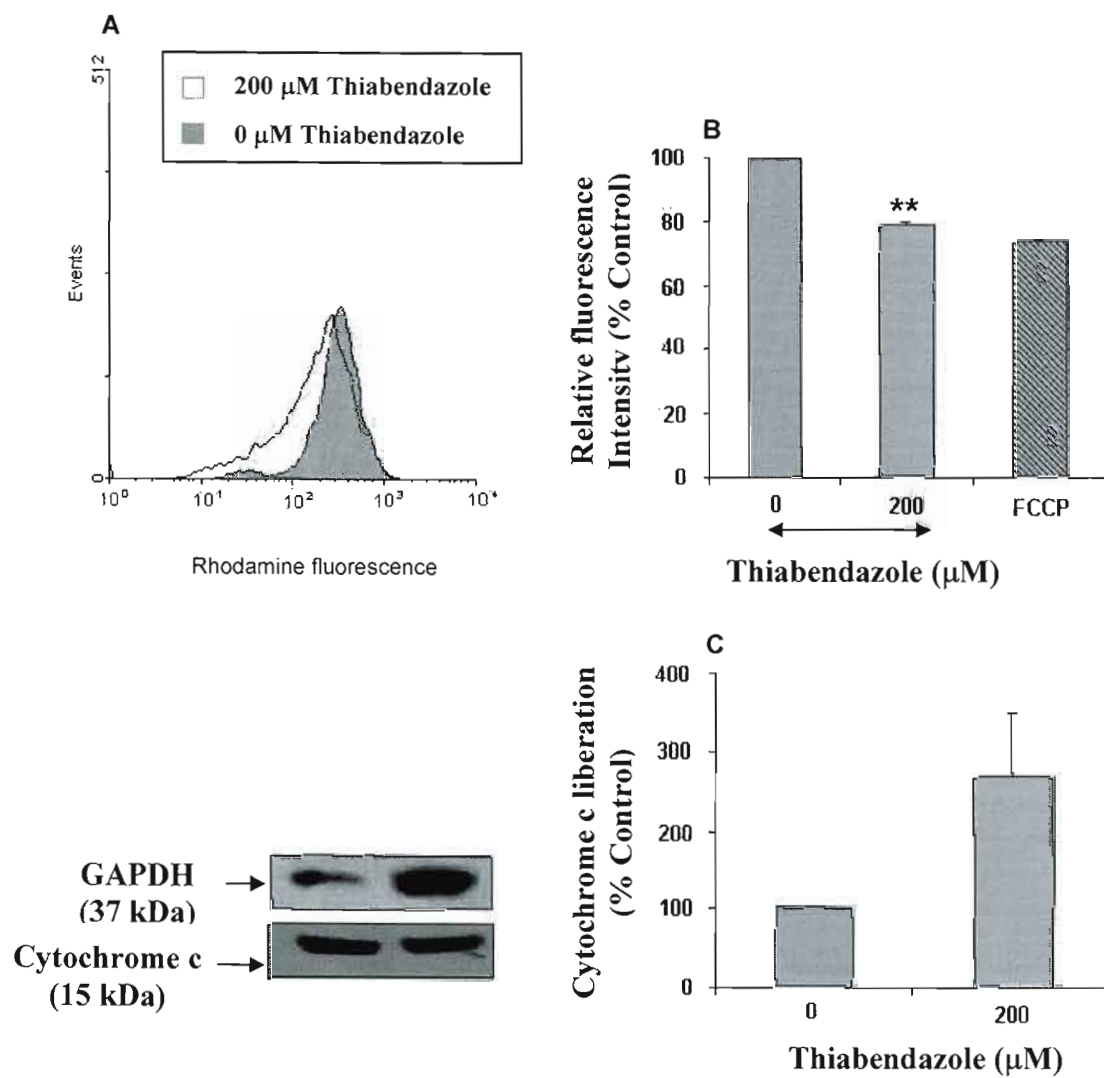


Fig. 9.18. Induction of $\Delta\Psi_m$ depolarization and liberation of cytochrome c by thiabendazole in rat hepatocytes.

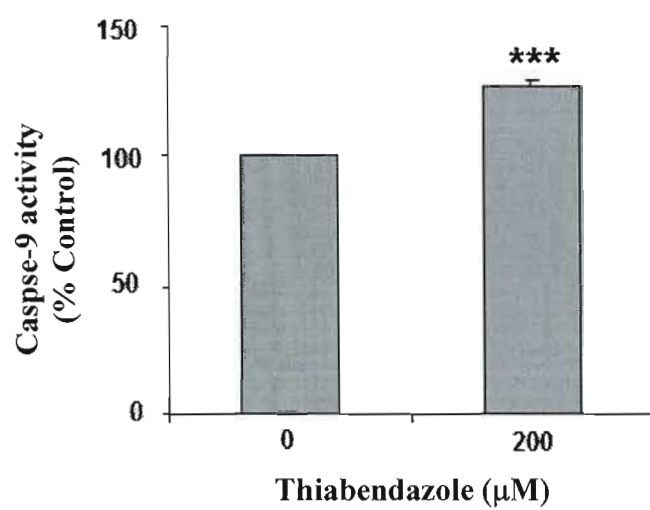


Fig. 9.19. Activation of initiator caspase-9 by thiabendazole in rat hepatocytes.

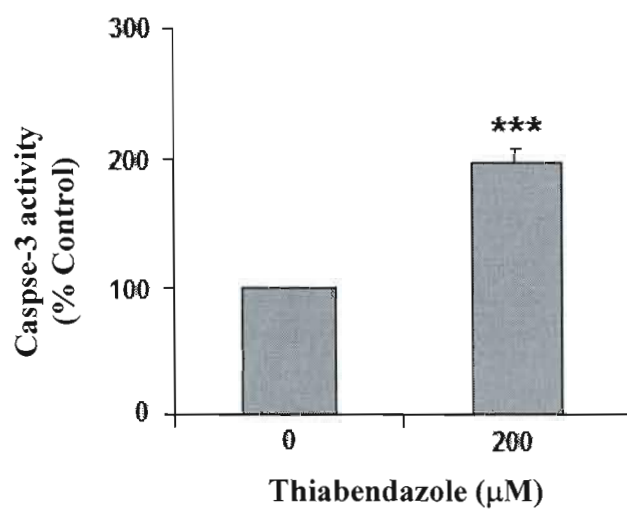


Fig. 9.20. Activation of executor caspase-3 by thiabendazole in rat hepatocytes.

CHAPITRE X

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Ce projet de recherche visait à évaluer, en cultures primaires d'hépatocytes de rats, le métabolisme et l'hépatotoxicité du thiabendazole et du mibéfradil, de même que le type de mort cellulaire induit par ces 2 médicaments. L'APAP, qui s'avère bien caractérisé et dont les mécanismes d'hépatotoxicité sont bien connus, nous a servi de composé de référence. Les résultats obtenus nous ont ainsi permis de déterminer les faits suivants :

1. L'exposition des hépatocytes de rat au mibéfradil ou à l'APAP, mais pas celle au thiabendazole, entraîne une hépatotoxicité se traduisant par une diminution de la viabilité cellulaire et par des changements morphologiques.

La mesure de la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu extracellulaire a montré que le mibéfradil (5-20 μ M) et l'APAP (10-40 mM) causent dans les hépatocytes de rat, après 24 et 48 h, une baisse de viabilité cellulaire qui croît avec la concentration et le temps. En particulier, la chute de viabilité la plus importante atteint 35% pour l'APAP (40 mM) et 34% pour le mibéfradil (20 μ M), après 48 h. Néanmoins, dans le cas d'une exposition des cellules au thiabendazole (100-500 μ M), aucun changement n'est mesuré par rapport aux cellules témoins. De plus, nous avons observé par microscopie optique que la présence de mibéfradil et d'APAP dans les cultures primaires d'hépatocytes entraîne des modifications phénotypiques (passage d'une forme polygonale et étendue à une morphologie sphérique), caractéristiques d'une action hépatotoxique de ces médicaments. Cependant, l'exposition au thiabendazole n'a pas d'effet évident sur la morphologie des cellules.

L'absence d'une baisse significative de la viabilité que nous avons mesurée avec des doses de 100-500 μM de thiabendazole s'avère en accord avec plusieurs articles dans lesquels aucun effet hépatotoxique significatif de ce composé n'est rapporté à cet intervalle de concentrations. Ainsi, Sugihara et al. (1997), entres autres, ont montré que l'exposition de cultures primaires d'hépatocytes de rat à 500 μM de thiabendazole pendant 10 h ne mène qu'à une diminution de la viabilité de l'ordre de 10%. Également, Lemaire et al. (2004) ont rapporté que ce médicament, à des doses de 100 à 250 μM , n'exerce aucune cytotoxicité dans des hépatocytes de rat isolés, après 24, 48 et 72 h d'exposition. Cependant, aucune étude n'avait jusqu'à présent évalué l'effet du mibéfradil sur la viabilité cellulaire d'hépatocytes. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré une diminution de la viabilité cellulaire suite à l'exposition d'hépatocytes à l'APAP. Par exemple, Nakagari et al. (2003) ont mesuré, dans des hépatocytes de rat, une baisse du taux de cellules vivantes après 48 h d'exposition à ce médicament, en particulier avec 20 mM d'APAP (viabilité cellulaire de 64.7%). Aussi, Macanas-Pirard et al. (2005) ont rapporté une chute de viabilité avec le temps et la concentration dans des lignées cellulaires d'hépatomes humains HuH7, avec 10 mM d'APAP; il s'agissait d'une diminution de 28% après 24 h, et de 68% après 48 h.

2. Le mibéfradil et l'APAP, mais pas le thiabendazole, mènent aussi à une diminution de la sécrétion d'albumine dans les hépatocytes de rat.

La synthèse d'albumine représente une fonction hépatospécifique, exercée exculsivement par les hépatocytes. Le dosage de l'albumine permet d'évaluer l'atteinte hépatocellulaire. Selon les résultats de notre étude, il y a une baisse marquée de la synthèse d'albumine par les hépatocytes de rat exposés durant 24 et 48 h à des concentrations croissantes de mibéfradil (5-20 μM) et d'APAP (5-40 mM). La sécrétion d'albumine par les hépatocytes de rat décroît d'un facteur de 2 lorsque ceux-ci sont exposés à 20 μM de mibéfradil. Cependant, il y a très peu de diminution avec le thiabendazole.

Ces résultats se montrent en accord avec les changements morphologiques et la baisse de viabilité cellulaire obtenus avec le mibéfradil et l'APAP, mais non observés avec le thiabendazole. Toutefois, notre étude est la première à évaluer la production d'albumine par des hépatocytes mis en présence de mibéfradil ou de thiabendazole. De plus, pour l'APAP, ils s'avèrent conformes aux données retrouvées dans la littérature. Par exemple, Shen et al. (2006) ont rapporté une baisse (par rapport au témoin négatif) de 68% de la production d'albumine après 24 h, et de 54% après 48 h, dans des hépatocytes de rat exposés à seulement 2.5 mM d'APAP. Également, Meng et al. (2006) ont montré que lorsque traités avec 10 mM d'APAP pendant 48 h, les hépatocytes de rat expriment un niveau cellulaire relatif d'environ 50% pour la synthèse d'albumine.

3. Le thiabendazole induit l'activité du CYP1A et du CYP2B dans les hépatocytes de rat; le mibéfradil induit également l'activité du CYP2B, mais n'exerce pas d'effet sur celle du CYP1A.

La connaissance des effets des médicaments sur toutes les isoformes des CYP450s, surtout les principales impliquées dans le métabolisme (ex. : CYP1A, CYP2B, CYP3A), permet d'éviter ou de minimiser les problèmes de toxicité aux organes clefs tels que le foie, et la toxicité engendrée par les interactions médicamenteuses. La modulation de l'activité des isoformes CYP1A1/2 et CYP2B1/2 du CYP450 dans les hépatocytes de rat a été évaluée dans cette étude par la mesure respective de l'activité de EROD et de PROD. Les résultats que nous avons obtenus montrent que le mibéfradil, le thiabendazole et l'APAP induisent chacun l'activité du CYP2B1/2, après 24 et 48 h d'incubation. Néanmoins, alors que le thiabendazole et l'APAP activent également le CYP1A1/2, le mibéfradil n'exerce pas d'effet sur cette isoforme du CYP450.

Or, d'une part, le thiabendazole est un inducteur connu de l'activité du CYP1A1/2 hépatique (Aix et al., 1994; Price et al., 2004) ; cette isoforme bioactive par ailleurs l'APAP en son métabolite actif (NAPQI) chez le rat (Patten et al., 1993; Kim et Lee, 1998), et il a même été rapporté que l'APAP induirait le CYP1A2 dans les hépatocytes de cette même espèce (Plewka et al., 2000). Au contraire, le mibéfradil est reconnu comme un inhibiteur du

CYP1A2 (Wiltshire et al., 1997; Welker, 1998). D'autre part, une activation significative de PROD a déjà été rapportée dans des fractions microsomiques de foie de rats nourris durant 28 jours avec des doses élevées de thiabendazole (Price et al., 2004). De plus, bien qu'aucune étude n'ait démontré l'activation de PROD par l'APAP ou le mibéfradil, le CYP2B1/2 a été identifié comme une des isoformes responsables du métabolisme de l'APAP dans les hépatocytes de rat (Rumack, 2002; Farkas et Tannenbaum, 2005).

4. Le mibéfradil et le thiabendazole causent l'apoptose dans les hépatocytes de rat, mais seul le mibéfradil mène à des hausses de la nécrose.

Au moyen du Hoechst-33258 et d'observations par microscopie en fluorescence, nous avons observé que le mibéfradil (5-20 μ M), le thiabendazole (100-500 μ M) et l'APAP (10-40 mM) causent dans les hépatocytes de rat la condensation de la chromatine, qui est un changement morphologique caractéristique de l'apoptose, suite à des traitements de 24 et 48 h. L'apoptose est observée de façon prédominante par rapport à la nécrose après 24 h : avec le mibéfradil et l'APAP, elle apparaît aux concentrations plus faibles (5-15 μ M pour le mibéfradil; 10 et 20 mM pour l'APAP); toutefois, l'apoptose est induite par 250-500 μ M de thiabendazole. Cependant, seule l'exposition au mibéfradil ou à l'APAP entraîne une hausse de la nécrose; celle-ci apparaît de façon plus importante et a prédominance sur l'apoptose pour les concentrations plus fortes de médicament, et au temps de traitement le plus élevé (48 h). En particulier, suite à l'exposition des hépatocytes de rat à 40 mM d'APAP durant 48 h, la nécrose devient le seul type de mort cellulaire observé. Il est connu que l'apoptose et la nécrose induites par des toxines constituent un continuum à deux étapes, ce qui explique que le mibéfradil et l'APAP induisent l'apoptose ou la nécrose selon la dose et le temps d'exposition (Kroemer et al., 1998).

Notre étude s'avère la première à montrer une induction de l'apoptose par le thiabendazole et le mibéfradil dans des cellules hépatiques. Cependant, nos résultats réitèrent un rôle de l'apoptose dans l'hépatotoxicité induite par l'APAP. En effet, Vaccarino et al.

(2006) ont montré, au moyen de la sonde Hoechst, que l'APAP induit la mort cellulaire apoptotique dans les cellules humaines HepG2 exposées à des doses plus faibles de 100 μ M d'APAP durant 6-8 h. Ceci suggère cependant que les cellules HepG2 sont beaucoup plus sensibles à ce composé toxique que les hépatocytes. Aussi, Macanas-Pirard et al. (2005) ont observé la condensation de la chromatine suite à l'exposition de cellules HuH7 d'hépatomes humains à 5 et 10 mM d'APAP durant 24 et 48 h. De plus, nos résultats sont conformes à l'hypothèse que l'APAP induit une apoptose hépatocellulaire qui dégénère en une nécrose avec le temps et l'augmentation de la concentration de médicament. Par exemple, Fiorucci et al. (2004) ont rapporté que l'exposition de cultures primaires d'hépatocytes de souris à 6.6 mM d'APAP aboutit de façon prédominante à une apoptose dans les premières heures (1-8 h), alors que la nécrose prévaut par la suite (8-24 h).

5. Le mibéfradil et le thiabendazole activent la phase d'initiation de la voie mitochondriale de l'apoptose et de la voie des récepteurs de mort dans les hépatocytes de rat

La phase d'initiation de l'apoptose se caractérise, entre autres, par : l'activation de caspases initiatrices, à savoir, la caspase-8 pour la voie des récepteurs de mort, et la caspase-9 pour la voie mitochondriale; une baisse du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et la libération du cytochrome c des mitochondries au cytosol (voie mitochondriale); la translocation de FADD du cytosol aux membranes (voie des récepteurs).

Ici, l'exposition des hépatocytes de rat à 200 μ M de thiabendazole ou à 5 mM d'APAP durant 1 h, ou à 5 μ M de mibéfradil pendant 12 h, provoque l'activation de la caspase-8. Ainsi, la cinétique d'activation s'avère plus rapide pour le thiabendazole et l'APAP que pour le mibéfradil. Nous sommes les premiers à rapporter l'activation de la caspase-8 initiatrice par le mibéfradil ou le thiabendazole dans des cellules hépatiques. Cependant, l'induction de l'activité de la caspase-8 par l'APAP a déjà été rapporté dans des cellules d'hépatomes humains (Boulares et al., 2002) et des hépatocytes de souris (Fiorucci et al., 2004), mais pour des temps de traitement d'au moins 6 h,

De plus, l'activation de la voie des récepteurs de mort par les trois médicaments évalués est confirmée dans notre étude par la translocation de FADD du cytosol aux membranes suite aux mêmes temps d'exposition et pour les mêmes concentrations que pour l'activation de la caspase-8. À notre connaissance, l'induction du déplacement de FADD aux membranes par le mibéfradil, le thiabendazole ou l'APAP n'a jamais été rapportée auparavant. Cependant, Tinel et al. (2004) ont montré que la stimulation subliminale du récepteur de mort Fas accroît l'hépatotoxicité de l'APAP chez la souris, ce qui suggère fortement un rôle de la voie des récepteurs de mort induite par Fas dans l'hépatotoxicité causée par l'APAP. De même, Tagani et al. (2003) ont mesuré une augmentation de la concentration de la forme soluble de Fas dans le sérum de patients atteints d'insuffisance hépatique aigue induite par une surdose d'APAP.

Par ailleurs, selon notre recherche, le mibéfradil (5 μ M), le thiabendazole (200 μ M) et l'APAP (5 mM) provoquent tous les trois une chute du $\Delta\Psi_m$ et la libération du cytochrome c dans le cytosol; ces phénomènes, qui sont spécifiques à la voie mitochondriale de l'apoptose, ont lieu après seulement 1 h avec le thiabendazole ou l'APAP, et après 3 h dans le cas du mibéfradil. Notre étude est la seule à rapporter l'induction de ces deux phénomènes par le mibéfradil ou le thiabendazole dans des cellules hépatiques. Toutefois, Fiorucci et al. (2004) ont déjà montré que l'APAP, à une concentration de 6.6 mM, mène à la baisse du $\Delta\Psi_m$ suivie de la translocation du cytochrome c des mitochondries au cytosol, mais à partir de 8 h d'exposition. De plus, Kon et al. (2004) ont observé, également dans des hépatocytes de souris, une dépolarisation mitochondriale après environ 4.5 h de traitement avec 10 mM d'APAP.

Dans la voie apoptotique mitochondriale, la libération du cytochrome c déclenche l'activation de la caspase-9 initiatrice. L'augmentation de l'activité de la caspase-9 que nous avons observée avec le mibéfradil (5 μ M, 3 h), le thiabendazole (200 μ M, 1 h) et l'APAP (5 mM, 3 h), appuie donc davantage l'hypothèse de l'activation de la voie mitochondriale par

ces médicaments. Notre étude est la première à démontrer que le thiabendazole (200 μ M) et le mibéfradil (5 μ M) induisent l'activité de la caspase-9. Toutefois, une étude publiée par Fiorucci et al. (2004) a rapporté l'induction de l'activité de la caspase-9 par l'APAP, à une concentration de 6.6 mM. Cette induction a cependant été mesurée après 6 h, donc pour un temps d'exposition plus important que dans notre étude, ce qui peut suggérer une réponse quelque peu différente entre les espèces souris et rat.

Ainsi, le thiabendazole et l'APAP activent les deux principales voies de l'apoptose (voie des récepteurs de mort et voie mitochondriale) rapidement, soit après 1 h. Cependant, avec le mibéfradil, la voie mitochondriale est activée avant celle des récepteurs (3 h vs 12 h, respectivement).

6. Le mibéfradil, le thiabendazole et l'APAP activent la phase d'exécution des deux principales voies apoptotiques dans les hépatocytes de rat

La voie mitochondriale et celle des récepteurs de mort convergent vers l'activation de la caspase-3 effectrice. La caspase-3 est le principal exécuter de la mort apoptotique; elle joue un rôle crucial dans le démantèlement des cellules en apoptose. Notre étude a montré que l'exposition des hépatocytes de rat à 200 μ M de thiabendazole ou à 5 mM d'APAP aboutit à l'activation de la caspase-3 dès 1 h. Cette caspase est également activée suite au traitement des cellules avec 5 μ M de mibéfradil, mais après seulement 12 h. Cependant, aucune donnée de la littérature ne rapporte l'activation de la caspase-3 par le mibéfradil ou le thiabendazole dans des hépatocytes ou tout autre type cellulaire. L'induction de l'activité de la caspase-3 par l'APAP a toutefois déjà été rapportée dans des hépatocytes de souris en culture (Kon et al., 2004), des lignées cellulaires d'hépatomes humains (Boulares et al., 2002; Boulares et Ren, 2004; Macanas-Pirard et al., 2005) et des lignées cellulaires non hépatiques (ex. : cellules MCF-7; cellules HeLa) (Boulares et Ren, 2004).

Synthèse des résultats obtenus

En résumé, parmi les trois médicaments, le mibéfradil, à de faibles doses micromolaires, est celui menant aux changements phénotypiques les plus importants et affectant le plus la viabilité (mesurée par la libération de la LDH) et le niveau de synthèse d'albumine (fonction hépatospecifique) des hépatocytes de rat. Nous avons de plus observé, à l'aide du PI, une augmentation importante de la nécrose avec le mibéfradil ; cette hausse croît. Éthiabendazole, peu d'hépatotoxicité ou d'effets sur la fonction hépatospecifique sont détectés. Également, l'activité du CYP1A1/2 et du CYP2B1/2 est induite par les médicaments, mis à part que le mibéfradil n'affecte pas l'activité du CYP1A1/2. Notre étude a par ailleurs montré que le mibéfradil, le thiabendazole et l'APAP induisent l'apoptose. Cette induction se manifeste par une activation des caspases-3, -8 et -9, une chute du $\Delta\Psi_m$, la libération du cytochrome c des mitochondries au cytosol, et la translocation de FADD du cytosol aux membranes. Tous ces événements apoptotiques sont déclenchés très rapidement (après 1 h) par le thiabendazole et l'APAP, en particulier. Avec le thiabendazole, aucune hépatotoxicité n'est mesurée par la libération du LDH, le marquage au PI ou des changements morphologiques. On détecte toutefois l'apoptose, laquelle représente donc un marqueur beaucoup plus sensible de dommages aux hépatocytes. Aussi, avec le mibéfradil et l'APAP, l'hépatotoxicité évaluée par l'apoptose est observée de manière plus précoce (après 12 h et 1 h, respectivement) qu'avec la mesure de la LDH, le PI et les observations morphologiques (après 24 h et 48 h).

Nos résultats proposent donc une action hépatotoxique du mibéfradil dans les hépatocytes de rat, plus importante que celle observée avec le thiabendazole et l'APAP. De plus, ils indiquent une activation de la voie mitochondriale de l'apoptose et de celle des récepteurs de mort par les trois médicaments évalués. Par ailleurs, la dose maximale recommandée d'exposition au mibéfradil (50 ou 100 mg par jour, soit 18.71 ou 37.42 μM en tenant compte du fait que la volémie moyenne chez un adulte est de 4.7 L) (Massie et al., 1997; 1998; Kobrin et al., 1997; Olesky, 2001) s'avère similaire aux concentrations employées dans cette étude (i.e. : 5-20 μM). De plus, la dose maximale recommandée

d'exposition au thiabendazole (3 g par jour, soit 3.17 mM) (Food and Drug Administration, 2003) est plus élevée que les concentrations utilisées (i.e. : 100-500 μ M). De fait, les données obtenues suggèrent que ces composés peuvent causer de l'hépatotoxicité chez l'humain.

La portée des résultats

L'hépatotoxicité induite par les médicaments représente aujourd'hui, dans la plupart des pays occidentaux, la première cause d'insuffisance hépatique aiguë (Keeffe, 2005), laquelle se montre mortelle dans 45 à 95% des cas dépendamment de l'étiologie (Fingerote et Bain, 1993 ; Caraceni et Van Thiel, 1995). De plus, les humains et les autres espèces sont constamment exposés à la toxicité des pesticides et des polluants de l'environnement (Ribas-Fitó et al., 2007; Brack et al., 2007). D'où l'importance d'accroître le plus possible nos connaissances concernant l'hépatotoxicité et la mort cellulaire que causent les nombreux médicaments utilisés chez l'humain et les substances toxiques agricoles et environnementales.

D'une part, notre étude a permis de confirmer certaines données de la littérature, à savoir : l'absence d'une cytotoxicité significative du thiabendazole dans des cultures primaires d'hépatocytes à des concentrations variant entre 100 et 500 μ M. Toutefois, nous avons détecté une hépatotoxicité par apoptose, un marqueur plus sensible que les marqueurs traditionnels (ex. : LDH).

D'autre part, et surtout, la plupart des résultats de notre recherche pour le mibéfradil et le thiabendazole n'ont, à notre connaissance, jamais été rapportés auparavant. De plus, il s'agit de la première étude rapportant que le mibéfradil exerce une action hépatotoxique directe, et que ce composé, de même que le thiabendazole, induit la diminution de la synthèse d'albumine par les hépatocytes. Également, nous sommes les premiers à nous pencher sur l'induction de l'apoptose par le thiabendazole et le mibéfradil dans des cellules hépatiques, et

à montrer que ces médicaments activent les deux principales voies apoptotiques (i.e. : la voie mitochondriale et celle des récepteurs de mort).

Cette recherche aura donc fait avancer les connaissances sur l'hépatotoxicité et la mort cellulaire induite dans les hépatocytes de rat pour ces médicaments; elle aura de plus servi à élucider quelles voies de signalisation de l'apoptose sont déclenchées par le mibéfradil et le thiabendazole. Également, notre étude suggère que ces deux composés peuvent s'avérer hépatotoxiques chez l'humain, puisqu'ils ont démontré une toxicité à des concentrations similaires ou inférieures aux doses maximales recommandées.

Il serait intéressant d'approfondir l'étude de la signalisation apoptotique induite par ces deux composés pharmacologiques en évaluant l'activation d'autres événements caractéristiques de la voie mitochondriale et de celle des récepteurs de mort, tels que la dégradation de cibles cellulaires par les caspases effectrices (ex. : PARP, ICAD), ou le clivage de Bid en tBid. Nous pourrions de plus explorer le déclenchement d'autres voies connues de l'apoptose, en particulier la voie du réticulum endoplasmique par l'évaluation de l'activation de la caspase-12. L'induction de la mort cellulaire par autophagie, qui implique les lysosomes, pourrait aussi être étudiée. La connaissance des mécanismes de toxicité du thiabendazole permettra d'investiguer les manières de diminuer cette hépatotoxicité. Dans le cas du mibéfradil, puisqu'il est retiré du marché, l'élucidation de ses mécanismes de toxicité va plutôt permettre de diriger la recherche sur le développement de médicaments similaires démontrant moins d'hépatotoxicité.

BIBLIOGRAPHIE

- Aix L., Rey-Grobellet X., Larrieu G., Lesca P., Galtier P. 1994. «Thiabendazole is an inducer of cytochrome P4501A1 in cultured rabbit hepatocytes». *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 202, p. 483-9.
- Albanis E., Friedman S. L. 2001. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis.*, vol.5, p.315-344.
- Allen P., Gootlied B. 1970. «Mechanism of action of the fungicide thiabendazole, 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole». *Appl Microbiol.*, vol. 20, p. 919-926.
- Asirvatham S., Sebastian C., Thadani U. 1998. «Choosing the Most Appropriate Treatment for Stable Angina: Safety Considerations». *Drug Saf.*, vol. 19, p. 23-44.
- Bader A., Knop E., Boker K. H., Crome O., Fruhauf N., Gonschior A. K., Christians U., Esselmann H., Pichlmayr R., Serwing K. F. 2004. «Tacrolimus (FK506) biotransformation in primary rat hepatocytes depends on extracellular matrix geometry». *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, vol 353, p. 461-473.
- Bae M. A., Pie J. E., Song B. J. 2001. «Acetaminophen induces apoptosis of C6 glioma cells by activating the c-Jun NH(2)-terminal protein kinase-related cell death pathway». *Mol Pharmacol.*, vol. 60, p. 847-56.
- Bajt M. L., Knight T. R., Lemasters J. J., Jaeschke H. 2004. «Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: Protection by N-acetyl cysteine». *Toxicol Sci.*, vol. 80, p. 343-349.
- Baliaharova V., Skalova L., Maas R. F., De Vrieze G., Bull S., Fink-Gremmels J. 2003. «The effects of mebendazole on P4501A activity in rat hepatocytes and HepG2 cells. Comparison with tiabendazole and omeprazole». *J Pharm Pharmacol.*, vol. 55, p. 773-81.
- Baracca A., Sgarbi G., Solaini G., Lenaz G. 2003. «Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis». *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1606, p.137-146.
- Bauer L., Raisys V, Watts M, and Ballinger J. 1982. «The pharmacokinetics of thiabendazole and its metabolites in an anephric patient undergoing hemodialysis and hemoperfusion». *J Clin Pharmacol.*, vol. 22, p. 276-280.
- Beaune P. Les cytochromes P450 humains. 1993. «Applications en pharmacologie». *Thérapie*, vol. 48, p. 521-526.

- Bedda S., Laurent A., Conti F., Chéreau C., Tran A., Tran-Van Nhieu J., Jaffray P., Soubrane O., Goulvestre C., Calmus Y., Weill B., Batteux F. 2003. «Mangafodipir prevents liver injury induced by acetaminophen in the mouse». *J Hepatol*, vol. 39, p. 765-72.
- Bernik P. J. L. M., Prager G., Schelling A., Kobrin I. 1996. «Antihypertensive properties of the novel calcium antagonist mibefradil (Ro 40-5967)». *Hypertension*, vol. 27, p. 426-432.
- Berry, M. N., Edwards, A. M. (éds.). 2000. *The Hepatocyte Review*, p. 391-410. Pays-Bas: Kluwer Academic Publishers.
- Berry M. N., Friend D. S. 1969. «High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study». *J Cell Biol.*, vol. 43, p. 506-20.
- Bertolini A., Ferrari A., Ottani A., Guerzoni S., Tacchi R., Leone S. 2006. «Paracetamol: new vistas of an old drug». *CNS Drug Rev.*, vol. 12, p. 250-75.
- Billups S. J., Carter B. L. 1998. «Mibefradil : a new class of calcium-channel antagonists». *Ann Pharmacother.*, vol. 32, p. 659-671.
- Blake B. L., Rose R. L., Mailman R. B., Levi P. E., Hodgson E. 1995. «Metabolism of thioridazine by microsomal monooxygenases: relative roles of P450 and flavin-containing monooxygenase». *Xenobiotica*, vol. 25, p. 377-393.
- Boess F., Kamber M., Romer S., Gasser R., Muller D., Albertini S., Suter L. 2003. «Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the *in vivo* liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of *in vitro* systems». *Toxicol Sci.*, vol. 73, p. 386-402.
- Boulares A..H et Ren T. 2004. «Mechanism of acetaminophen-induced apoptosis in cultured cells : roles of caspase-3, DNA fragmentation factor, and the Ca^{2+} and Mg^{2+} endonuclease DNAS1L3». *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, vol. 94, p. 19-24.
- Boulares A. H., Zoltski A. J., Stoica B. A., Cuvillier O., Smulson M. E. 2002. «Acetaminophen induces a caspase-dependent and Bcl-x_L sensitive apoptosis in human hepatoma cells and lymphocytes». *Pharmacol Toxicol.*, vol. 90, p. 38-50.
- Brack W., Klamer H. J., López de Alda M., Barceló D. 2007. «Effect-directed analyses of key toxicants in European river basins a review». *Environ Sci Pollut Res Int.*, vol 14, p. 30-8.
- Bradford M. M. 1976. «A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding». *Anal Biochem*, vol. 72, p. 248-254.
- Bradley, N. Naming of drugs. 1996. «BMJ should use “paracetamol” instead of “acetaminophen” in its index». *BMJ*, vol. 313, p. 689.

- Burcham P. C., Harman A. W. 1991. «Acetaminophen toxicity results in site-specific mitochondrial damage in isolated mouse hepatocytes». *J Biol Chem.*, vol. 266, p. 5049-54.
- Burke M. D., Thompson S., Elcombe C. R., Halpert J., Haaparanta T., Mayer T. 1985. «Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450». *Biochem Pharmacol.*, vol 34, p. 3337-3345.
- Caraceni P, Van Thiel DH. 1995. «Acute liver failure». *Lancet.*, vol 345, p. 163-9.
- Cardinal G. 1992. «Étude du cytochrome P-450 dans des conditions de prolifération et de différenciation cellulaires sur les hépatocytes de rat adulte en culture primaire». Mémoire de maîtrise, Montréal, Université du Québec à Montréal, 110 p.
- Carter D. C., Ho J. X. 1994. «Structure of serum albumin». *Adv Protein Chem.*, vol. 45, p. 153-203.
- Chang C. Y., Schiano T. D. 2007. «Review article: drug hepatotoxicity». *Aliment Pharmacol Ther.*, vol. 25, p. 1135-51.
- Chen L. B. 1988. «Mitochondrial membrane potential in living cells». *Annu Rev Cell Biol.*, vol. 4, p. 155-181.
- Corvilain B. 1997. «Lipoprotein metabolism». *Rev Med Brux.*, vol. 18, p. 3-9.
- Cossarizza A. 2003. «Tests for mitochondrial function and DNA: potentials and pitfalls». *Curr Opin in Infect Dis.*, vol. 16, p. 5-10.
- Cossarizza A., Kalashnikova G., Grassilli E., Chiapelli F., Salvioli S., Capri M., Barbieri D., Troiano L., Monti D., Franceschi C. 1994. «Mitochondrial modifications during rat thymocyte apoptosis: a study at the single cell level». *Exp Cell Res.*, vol 214, p. 323-330.
- Coulet M., Dacasto M., Eeckhoutte C., Larrieu G., Sutra J. F., Alvinerie M., Mace K., Pfeifer A. M., Galtier P. 1998. «Identification of human and rabbit cytochromes P450 1A2 as major isoforms involved in thiabendazole 5-hydroxylation». *Fundam Clin Pharmacol.*, vol. 12, p.225-235.
- Coulet M., Eeckhoutte C., Larrieu G., Sutra J. F., Alvinerie M., Mace K., Pfeifer A. M. A., Zucco F., Stamatii A. L., De Angelis I., et al. 2000. «Evidence for cytochrome P4501A2 mediated protein covalent binding of thiabendazole and for its passive intestinal transport: use of human and rabbit derived cells». *Chem Biol Interact.*, vol. 127, p. 109–124.
- Dalvie D., Smith E., Deese A., Bowlin S. 2006. «In vitro metabolic activation of thiabendazole via 5-hydroxythiabendazole: identification of a glutathione conjugate of 5-hydroxythiabendazole». *Drug Metab Dispos.*, vol. 34, p.709-717.

- Daum F., Zucker P. Cohen M. I. 1976. «Acute liver failure and encephalopathy (Reye's syndrome?) during salicylate therapy». *Acta Paediatr Scand.*, vol. 65, p. 747.
- Davey H. M., Kaprelyants A. S., Kell D. B. 1993. «Flow cytometric analysis, using Rhodamine 123, of *Micrococcus luteus* at Low Growth Rate in Chemostat Culture». In *Flow cytometry in Microbiology*, Lloyd D. (éd.), p. 83-93. Londres: Springer-Verlag.
- Deepak N. A., Patel N. D. 2006. «Differential diagnosis of acute liver failure in India». *Ann Hepatol.*, vol. 5, p. 150-156.
- Dehili C., Lee P., Shakesheff K. M., Alexander M. R. 2006. «Comparison of primary hepatocyte attachment to collagen and plasma-polymerised allylamine on glass». *Plasma Process Polym.*, vol. 3, p. 474-484.
- Delescluse C., Ledirac N., Li R., Piechocki M. P., Hines R. N., Gidrol X., Rahmani R. 2001. «Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells». *Biochem Pharmacol.*, vol. 61, p. 339-407.
- Denicola A., Radi R. 2005. «Peroxynitrite and drug-dependent toxicity». *Toxicology*, vol. 208, p. 273-288.
- Dietze E. C., Shafer A., Omichinski J. G., Nelson S. D. 1997. «Inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by reactive metabolite of acetaminophen and mass spectral characterization of and arylated active site peptide». *Chem Res Toxicol.*, vol. 10, p. 1097-103.
- Draganov P., Durrence H., Cox C., Reuben A. 2000. «Alcohol-acetaminophen syndrome: even moderate social drinkers are at risk». *Postgrad Med.*, vol. 107, p. 189-95.
- Drobyshev A. L., Zasedatelev A. S., Yershov G. M., Mirzabekov A. D. 1999. «Massive parallel analysis of DNA-Hoechst 33258 binding specificity with a generic oligodeoxyribonucleotide microchip». *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, p. 4100-4105.
- Dunn J. C., Yarmush H. G., Koebe H. G., Tompkins R. G. 1989. «Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration». *FASEB J.*, vol. 3, p. 174-177.
- du Souich P., Besner J. G., Clozel J. P., Welker H. A., Lefebvre M., Caillé G. 2000. «Nonlinear kinetics and pharmacologic response to mibefradil». *Clin Pharmacol Ther.*, vol. 67, p. 249-57.

Dyke K. V., Ghareeb E., Dyke M. V., Thiel D. H. 2007. «Ultrasensitive peroxynitrite-based luminescence with L-012 as a screening system for antioxidative/antinitrating substances, e.g. Tylenol((R)) (acetaminophen), 4-OH tempol, quercetin and carboxy-PTIO». *Luminescence*, vol. 22, p.267-274.

European Medicines Agency, Veterinary Medicines and Inspections-Committee for medicinal products for veterinary use. 2004. "Thiabendazole (extrapolation to goats). Summary report (3)", <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/086803en.pdf>, (January 13, 2008).

Fardel O., Payen L., Sparfel L., Vernhet L., Lecureur V. 2002. «Drug membrane transporters in the liver: regulation of their expression and activity». *Ann Pharm Fr.*, vol. 60, p. 380-385.

Farkas D., Tannenbaum S. R. 2005. «Characterization of chemically induced hepatotoxicity in collagen sandwiches of rat hepatocytes». *Toxicol Sci.*, vol. 85, p. 927-34.

Fingerote RJ, Bain VG. 1993. «Fulminant hepatic failure». *Am J Gastroenterol.*, vol. 88, no7, p. 1000-10.

Fiorucci S., Antonelli E., Distrutti E., Mencarelli A., Farneti S., Del Soldato P., Morelli A. 2004. «Liver delivery of NO by NCX-1000 protects against acute liver failure and mitochondrial dysfunction induced by APAP in mice». *Br J Pharmacol.*, vol. 143, p. 33-42.

Food and Drug Administration. 2003. "Chewable tablets and suspension. Mintezol® (Thiabendazole)", http://www.fda.gov/medwatch/safety/2003/03Jun_PI/Mintezol_PI.pdf, (20 mars 2007).

Food and Drug Administration. 2002. "Open APAP. McNeil Consumer & Specialty Pharmaceuticals", http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/briefing/3882B1_13_McNeil-Acetaminophen.pdf, (January 15th, 2008).

Food and Drug Administration. 1998. "Roche Laboratories Announces Withdrawal of Posicor from the market", <http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/ANS00876.html>, (25 mars 2007).

Gonzalez F. J. 1988. «The molecular biology of cytochrome P450s». *Pharmacol Rev.*, vol. 40, no 4, p. 243-288.

Greek R, Greek J. 2002. «Searching for alternatives». *Nat Biotechnol.*, vol. 20, p. 431-2.

Guengerich F. P. 2006. «Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity». *AAPS J.*, vol 8, p.101-111.

Guengerich F. P. 1996. «*In vitro* techniques for studying drug metabolism». *J Pharmacokin Biopharm.*, vol. 24, p. 521-533.

Guengerich F. P., Liebler D. C. 1985. «Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites». *CRC Crit Rev Toxicol.*, vol. 14, p. 259-307.

- Gueniche K. 2002. *L'énigme de la greffe: le je, de l'hôte à l'autre*. Paris: L'Harmattan, 233 p.
- Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. 2002. «Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice : apoptosis or oncotic necrosis ?» *Toxicol Sci.*, vol. 67, p. 322-328.
- Gupta S., Rajvanshi P., Sokhi R., Vaidya S., Irani A. N., Gorla G. R. 1999. «Position-specific gene expression in the liver lobule is directed by the microenvironment and not by the previous cell differentiation state». *J Biol Chem.*, vol. 274, p. 2157-2165.
- Gyamlani G. G., Parikh C. R. 2002. «Acetaminophen toxicity : suicidal vs accidental». *Crit Care.*, vol 6, p. 155-159.
- Halmes N. C., Samokyszyn V. M., Hinton T. W., Hinson J. A., Pumford N. R. 1998. «The acetaminophen regioisomer 3'-hydroxyacetanilide inhibits and covalently binds to cytochrome P450 2E1». *Toxicol Lett.*, vol. 94, p. 65-71.
- Hamanaka S. 2005. «Lethal suicide attempts and parasuicide in drug overdose patients». *Chudoku Kenkyu.*, vol. 18, p.123-126.
- Haugland R. P. 2002. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9^e éd. Eugene (Oregon): Molecular Probes.
- Hengartner M. O. 2000. «The biochemistry of apoptosis». *Nature*, vol. 407, p. 770-6.
- Henkens T., Vinken M., Vanhaecke T., Rogiers V. 2007. «Modulation of CYP1A1 and CYP2B1 expression upon cell cycle progression in cultures of primary rat hepatocytes». *Toxicol In Vitro.*, vol. 21, no 7, p. 1253-1257.
- Horne E., Coyle T., O'Keeffe M., Alvinerie M., Galtier P., Brandon D. L. 2003. «Release of protein-bound residues of thiabendazole from liver». *J Agric Food Chem.*, vol. 51, p.5552-5555.
- Howard R. B., Pesch L. A. 1968. «Respiratory activity of intact, isolated parenchymal cells from rat liver». *J Biol Chem.*, vol. 243, p. 3105-109.
- Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yeppez S, Livingston ED. 2007. «Screening and detection of apoptosis». *J Surg Res.*, vol. 139, no 1, p. 143-156.
- Ioannou Y. A., Chen F. W. 1996. «Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis». *Nucleic Acids Res.*, vol. 24, p. 992-993.
- Jacquemin E. 1998. «Sécrétion biliaire». *MT Pédiatrie*, vol. 1, p. 179-85.
- Jae S. L., Obach R. S., Fisher M. B. 2003. *Drug metabolizing enzymes: cytochrome P450 and other enzymes in drug discovery and development*. New York: Informa Health Care, 608 p.

- Jaeschke H. 2005. «Comments on: "Glycogen synthase kinase-3 mediates acetaminophen-induced apoptosis in human hepatoma cells"». *J Pharmacol Exp Ther.*, vol. 314, p. 1401-1402.
- Jaeschke H., Gujral J. S., Bajt M. L. 2004. «Apoptosis and necrosis in liver disease». *Liver Int.*, vol. 24, p. 85-89.
- Jaeschke H., Bajt M. L. 2006. «Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death». *Toxicol Sci.*, vol. 89, p. 31-41.
- Jaeschke H., Gujral J. S., Bajt M. L. 2004. «Apoptosis and necrosis in liver disease». *Liver Int.*, vol. 24, p. 85-89.
- Jaeschke H., Knight T. R., Bajt M. L. 2003. «The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity». *Toxicol Lett.*, vol. 144, p. 279-88.
- Johnson L. V., Walsh M. L., Bockus B. J., Chen L. B. 1981. «Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy». *J Cell Biol.*, vol. 88, no 3, p. 526-435.
- Jones A. L., Simpson K. J. 1999. «Review article : mechanisms and management of hepatotoxicity in ecstasy (MDMA) and amphetamine intoxications». *Aliment Pharmacol Ther.*, vol 13, p. 129-133.
- Jones A. L. 1999. «Mechanisms of action and value of N-acetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: a critical review». *Clin Toxicol .*, vol. 25, p. 277-285.
- Jones A. L., Spring-Mills E. 1984. «The liver and gallbladder». In *Modern Concepts of Gastrointestinal Histology*, Weiss L. (éd.), p. 706-748. New York: Elsevier.
- Kam P. C. A., Ferch N. I. 2000. «Apoptosis : mechanisms and clinical implications». *Anesthesia*, vol. 55, p. 1081-1093.
- Keeffe E. B. 2005. «Acute liver failure». *Rev Gastroenterol Mex.*, vol. 70, p. 56-62.
- Kim Y. C., Lee S. J. 1998. «Temporal variation in hepatotoxicity and metabolism of acetaminophen in mice». *Toxicology*, vol. 128, p. 53-61.
- Kleiner D. E., Gaffey M. J., Sallie R., Tsokos M., Nichols L., McKenzie R., Straus S. E., Hoofnagle J. H. 1997. «Histopathologic changes associated with fialuridine hepatotoxicity». *Mod Pathol.*, vol. 10, p. 192-9.
- Kmieć Z. 2001. «Cooperation of liver cells in health and disease». *Adv Anat Embryol Cell Biol.*, vol. 161, p. 1-151.

- Knight T. R., Jaeschke H. 2002. «Acetaminophen-induced inhibition of Fas receptor-mediated liver cell apoptosis: mitochondrial dysfunction versus glutathione depletion». *Toxicol Appl Pharmacol.*, vol. 181, p. 133-41.
- Kobrin I., Charlon V., Lindberg E., Pordy R. 1997. «Safety of mibefradil, a new once-a-day, selective T-type calcium channel antagonist». *Am J Cardiol.*, vol. 80, p. 40C-46C.
- Kon K., Ikejima K., Okumura K., Aoyama T., Arai K., Takei Y., Lemasters J. J., Sato N. 2007. «Role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity». *J Gastroenterol Hepatol.*, vol. 22, Suppl 1, p. S49-S52.
- Kon K., Kim J. S., Jaeschke H., Lemasters J. J. 2004. «Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes». *Hepatology*, vol. 40, p. 1170-79.
- Kozin E. D., Reddy K. R. 2006. «Is long-term survival of liver transplant recipients improved by mycophenolate mofetil combination therapy?» *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*, vol. 3, p. 132-133.
- Krauss G. 2001. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 2^e éd., Weinheim: Willey-VCH, 541 p.
- Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. 1998. «The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis». *Annu Rev Physiol.*, vol. 60, p. 619 -42.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. 2007. «Mitochondrial membrane permeabilization in cell death». *Physiol Rev.*, vol. 87, p. 99-163.
- Laemmli U. K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *Nature*, vol. 227, p. 680-885.
- Laperche Y. 2003. «Les cellules ovales et la régénération du foie». *Med Sci.*, vol. 19, p. 697-698.
- Larrey, D. 1986. «Polymorphisme génétique du métabolisme hépatique des médicaments». *Med Sci.*, vol. 2, p. 364-72.
- Larrey D., Pageaux G. P. 2005. «Drug-induced acute liver failure». *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, vol. 17, p. 141-3.
- Larsen G. L., Feil V. J., Bakke J. E. 2000. «Metabolism of N'-isopropylacetanilide in rat». *Xenobiotica*, vol. 30, p. 1153-7.
- Larsen F. S., Hansen B. A., Blei A. T. 2002. «Intensive care management of patients with acute liver failure with emphasis on systemic hemodynamic instability and cerebral edema : A critical appraisal of pathophysiology». *Can J Gastroenterol.*, vol 14, p. 105-111.

Larson A. M., Polson J., Fontana R. J., Davern T. J., Lalani E., Hynan L. S., Reisch J. S., Schiodt F. V., Ostapowicz G. Shakil A. O., Lee W. M. 2005. «Acetaminophen-induced acute liver failure : results of a United States multicenter, prospective study». *Hepatology*, vol. 42, p. 1364-72.

Latchoumycandane C., Goh C. W., Ong M. M., Boelsterli U. A. 2007. «Mitochondrial protection by the JNK inhibitor leflunomide rescues mice from acetaminophen-induced liver injury». *Hepatology*, vol. 45, p. 412-21.

Lawson J. A., Fisher M. A., Simmons C. A., Farhood A., Jaeschke H. 1999. «Inhibition of Fas receptor (CD95)-induced hepatic caspase activation and apoptosis by acetaminophen in mice». *Toxicol Appl Pharmacol.*, vol. 156, p. 179-186.

Lee W. M. 2003a. «Acute liver failure in the United States». *Semin Liver Dis.*, vol 23, p. 217-226.

Lee W. M. 2003b. «Drug-induced hepatotoxicity.». *N Engl J Med.*, vol. 349, p. 474-485.

Lemaire G., Delescluse C., Pralavorio M., Ledirac N., Lesca P., Rahmani R. 2004. «The role of protein tyrosine kinases in CYP1A1 induction by omeprazole and thiabendazole in rat hepatocytes». *Life Sci.*, vol.74, p.2265-2278.

Li M., Hansen J. B., Huang L., Keyser B. M., Taylor J. T. 2005. «Towards selective antagonists of T-type calcium channels: design, characterization and potential applications of NNC 55-0396». *Cardiovasc Drug Rev.*, vol. 3, p. 173-196.

Lifshitz M., Gavrilov V. 2002. «Deliberate self-poisoning in adolescents». *Isr Med Assoc J.*, vol 4, no 4, p. 252-254.

Lichtan S. M. 2006. «Therapy insight: therapeutic challenges in the treatment of elderly cancer patients». *Nat Clin Pract Oncol.*, vol. 3, p. 86-93.

Lodish H. F., Darnell J. E. 1997. *Biologie moléculaire de la cellule*, 3^e éd. DeBoeck-Wesmael. Bruxelles. 1344 p.

Luttringer O., Theil F. P, Lavé T., Wernli-Kuratli K., Guentert T. W., Saizieu A. 2002. «Influence of isolation procedure, extracellular matrix and dexamethasone on regulation of the membrane transporters gene expression in rat hepatocytes». *Biochem Pharmacol.*, vol. 64, no 11, p. 1637-1650.

Ma B., Prueksaritanont T., Lin J. H. 2000. «Drug interactions with calcium channel blockers: possible involvement of metabolite-intermediate complexation with CYP3A». *Drug Metab Dispos.*, vol. 28, p. 125-30.

Macanas-Pirard P., Yaacob N. S., Lee P. C., Holder J. C., Hinton R. H., Kass G. E. 2005. «Glycogen synthase kinase-3 mediates acetaminophen-induced apoptosis in human hepatoma cells». *J Pharmacol Exp Ther.*, vol. 313, p. 780-9.

Madan A., Dettaan R., Midra D., Carroll K., LeCluyse E., Parkinson A. 1999. «Effect of cryopreservation on cytochrome P-450 enzyme induction in cultures rat hepatocytes». *Drug Metab Dispos.*, vol. 27, p. 327-35.

Marieb É.N. 1999. *Anatomie et physiologie humaines*, 2^e éd. Saint-Laurent (Québec): Éditions du Renouveau Pédagogique, 1194 p.

Martinon F., Burns K., Tschopp J. 2002. «The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta». *Mol Cell.*, vol. 10, p 417-26.

Maslansky C. J., Williams G. M. 1982. «Primary cultures and the levels of cytochrome P450 in hepatocytes from mouse, rat, hamster, and rabbit liver». *In vitro.*, vol. 18, p.663-693.

Massie B. M. 1997. «Mibefradil: a selective T-type calcium antagonist». *Am J Cardiol.*, vol. 80, p. 231-321.

Massie B. M. 1998. «Mibefradil, a T-type channel-selective calcium antagonist: clinical trials in chronic stable angina pectoris». *Am J Hypertens.*, vol. 11, p. 95-102.

McCloskey P., Edwards R. J., Tootle R., Selden C., Roberts E., Hodgson, H. J. F. 1999. «Resistance of three immortalized human hepatocyte cell lines to acetaminophen and *N*-acetyl-p-benzoquinoneimine toxicity». *J Hepatol.*, vol. 31, p. 841-51.

MedecineNet.com. 2005. «Generic name: mibefradil-oral», <http://www.medicinenet.com/mibefradil-oral/article.htm>, (25 mars 2007).

Meeks R. G, Harrison SD, Bull RJ. 1991. *Hepatotoxicology*. Boca Raton (Florida): CRC Press, 700 p.

Meng Q., Zhang G., Shen C., Hongxia Q. 2006. «Sensitivities of gel entrapped hepatocytes in hollow fibers to hepatotoxic drug». *Toxicol Lett.*, vol. 166, p. 19-26.

Meredith T. J., Jacobsen D., Haines J A., Berger J. C. (éd.). 1995. *Antidotes for poisoning by paracetamol*. IPCS/EC. Evaluation of antidotes series. Cambridge: Cambridge University Press, 203 p.

Mirkes P. E. 2002. «2001: Warkany lecture : To die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development». *Teratology*, vol. 65, p. 228-239.

Mitchell J. R., Thorgeirsson S. S., Potter W. Z., Jollow D. J., Keiser H. 1974. «Acetaminophen-induced hepatic injury: protective effect of glutathione in man and rationale for therapy». *Clin Pharmacol Ther.*, vol. 16, p. 676-684.

Mizutani T, Ito K, Nomura H, and Nakanishi K. 1990. «Nephrotoxicity of thiabendazole in mice depleted of glutathione by treatment with DL-buthionine sulfoximine». *Food Chem Toxicol.*, vol. 28, p. 169-177.

Mizutani T, Yoshida K, and Kawazoe S. 1994. «Formation of toxic metabolites from thiabendazole and other thiazoles in mice. Identification of thioamides as ring cleavage products». *Drug Metab Dispos.*, vol. 22, p. 750-755.

Mohi-ud-din R., Lewis J. H. 2004. «Drug- and chemical-induced cholestasis». *Clin Liver Dis.*, vol. 8, p.95-132.

Mokhlesi B., Garimella P. S., Joffe A., Velho V. 2004. «Street drug abuse leading to critical illness». *Intensive Care Med.*, vol. 30, p. 1526-1536.

Moldeus P., Hogberf J., Orrenius S. 1978. «Isolation and use of liver cells». *Methods Enzymol.*, vol. 52, p. 60-71.

Motluk A. 2005. «Safe painkiller is leading case of liver failure». *New Scientist Magazine*, vol. 2529, p.19.

Murray, M. P450 enzymes. 1992. «Inhibition mechanisms, genetic regulation and effects of liver disease». *Clin Pharmacokin.*, vol. 23, p. 132-146.

Nakagawa Y., Moore G. A. 1995. «Cytotoxic effects of postharvest fungicides, ortho-phenylphenol, thiabendazole and imazalil, on isolated rat hepatocytes». *Life Sci.*, vol. 57, p. 1433-40.

Nakagiri R., Oda H., Kamiya T. 2003. «Small scale rat hepatocyte primary culture with applications for screening hepatoprotective substances». *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 67, p. 1629-1635.

Nebe B., Kunz F., Peters A., Rychly J., Noack T., Beck R. 2004. «Induction of apoptosis by the calcium antagonist mibefradil correlates with depolarization of the membrane potential and decreased integrin expression in human lens epithelial cells». *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*, vol. 242, p. 597-604.

Nelson, S. D. 1990. «Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen». *Semin Liver Dis.*, vol. 10, p. 267-78.

Nicholson D. W., Ali A., Thornberry N. A., Vaillancourt J. P., Ding C. K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P. R., Labelle M., Lazebnik Y. A., Munday N. A., Raju S. M., Smulson M. E., Yamin T.-T., Yu V. L., Miller D. K. 1995. «Identification and inhibition of ICE/Ced-3 proteases necessary for mammalian apoptosis». *Nature*, vol. 76, p. 37-43.

- Olesky W. G. 2001. *The Circulatory system*. New York: The Rosen Publishing Group, 48 p.
- Yin X.-M., Dong Z. 2003. *Essentials of apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*. Totowa (New Jersey): Humana Press, 259 p.
- Oparil S., Kobrin I., Abernethy D. R., Levine B. S., Reif M. C., Shepherd A. M. 1997. «Dose-response characteristics of mibefradil, a novel calcium antagonist, in the treatment of essential hypertension». *Am J Hypertens.*, vol. 0, p. 735-742.
- Ortiz de Montellano P. R. 1995. *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry*, 2^e éd. New York: Plenum Press, 652 p.
- Ostapowicz G., Fontana R. J., Schiodt F. V., Larson A., Davern T. J., Han S. H. B., McCashland T. M., Shakil A. O., Hay T. E., Hynan L., Crippin J. S., Blei A. T., Samuel G., Reisch J., Lee W. M. 2002. «Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States ». *Ann Intern Med.*, vol 137, p. 947-954.
- Park B. K., Kitteringham N. R., Maggs J. L., Pirmohamed M., Williams D. P. 2005. «The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity». *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 45, p. 177-202.
- Patten C. J., Thomas P. E., Guy R. L., Lee M., Gonzalez F. J., Guengerich F. P., Yang C. S. 1993. «Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics». *Chem Res Toxicol.*, vol. 6, p. 511-518.
- Pessayre, D. 1993. «Cytochromes P450 et formation de métabolites réactifs. Rôle dans l'hépatotoxicité des médicaments». *Thérapie*, vol. 48, p. 537-548.
- Petzinger E., Geyer J. 2006. «Drug transporters in pharmacokinetics». *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, vol. 372, p. 465-475.
- Pirmohamed M., Breckenridge A. M., Kitteringham N. R., Park B. K. 1998. «Adverse drug reactions». *BMJ*, vol. 316, p. 1295-98.
- Plaa G. L., Hewitt W. R. (éds.) 1998. *Toxicology of the liver*, 2^e édition. Washington (DC): Taylor and Francis, 431 p.
- Plewka A., Zielinska-Psujka B., Kowalowska-Zawieja J., Nowaczyk-Dura G., Plewka D., Wiaderkiewicz A., Kaminski M., Orlowski J. 2000. «Influence of acetaminophen and trichloroethylene on liver cytochrome P450-dependent monooxygenase system». *Acta Biochim Pol.*, vol. 47, p. 1129-36.
- Prescott L. F. 2000. «Paracetamol : past, present and future». *Am J Ther.*, vol. 7, p. 143-7.
- Price R. J., Scott M. P., Walters D. G., Stierum R. H., Groten J. P., Meredith C., Lake B. .G 2004. «Effect of thiabendazole on some rat hepatic xenobiotic metabolizing enzymes». *Food Chem Toxicol.*, vol 42, p.899-908

- Prueksaritanont T., Ma B., Tang C., Meng Y., Assang C., Lu P., Reider P. J., Lin J. H., Baillie T. A. 1999. «Metabolic interactions between mibefradil and HMG-CoA reductase inhibitors: an in vitro investigation with human liver preparations». *Br J Clin Pharmacol.*, vol. 47, p. 291-298.
- Putchá G. V., Le S., Frank S., Besirli C. G., Clark K., Chu B., Alix S., Youle R. J., LaMarche A., Maroney A. C., Johnson E. M. 2003. «JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis». *Neuron.*, vol. 38, p. 899-914.
- Rahman T. M., Hodgson H. J. 1999. «Review article: support systems in acute hepatic failure». *Aliment Pharmacol Ther.*, vol. 13, p. 1255-1272.
- Rappaport A.M. 1987. «Physioanatomic considerations». In *Diseases of the liver*, p. 1-46. Philadelphia: Lippincott Co.
- Rauckman E. J., Padilla G. M. (éds). 1987. *The isolated hepatocyte: use in toxicology and xenobiotic biotransformations*. Londres: Academic Press Inc., 292 p.
- Ray S. D., Mumaw V. R., Raje R. R., Fariss M. W. 1996. «Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment». *J Pharmacol Exp Ther.*, vol. 279L, p. 1470-83.
- Reader S., Moutardier V., Denizeau F. 1999. «Tributyltin triggers apoptosis in trout hepatocytes : the role of Ca^{2+} , protein kinase C and proteases». *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1448, p. 473-485.
- Reese J. A., Byard J. L. 1981. «Isolation and culture of adult hepatocytes from biopsies», *In vitro*, vol. 17, p. 935-940.
- Rey-Grobellet X., Eeckhoutte C., Sutra J. F., Alvinerie M., Galtier P. 1996. «Major involvement of rabbit liver cytochrome P4501A in thiabendazole 5-hydroxylation». *Xenobiotica*, vol. 26, p. 765-778.
- Ribas-Fitó N., Torrent M., Carrizo D., Júlvez J., Grimaldt J. O., Sunyer J. 2007. «Exposure to hexachlorobenzene during pregnancy and children's social behavior at 4 years of age». *Environ Health Perspect.*, vol. 115, p. 447-50.
- Ronot A., Benel L., Adolphe M., Mounolou J. C. 1986. «Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry». *Biol Cell.*, vol. 57, p.1-7.
- Rosenthal P. 2006. «Current strategies and future developments in artificial liver support». *US gastroenterology review*, p. 71-73.
- Roth R. A., Luyenduk J. P., Maddox J. F., Ganey P. E. 2003. «Inflammation and drug idiosyncrasy-Is there a connection? ». *JPET*, vol. 307, p. 1-8.

- Roy M. A., Nugent F. W., Aretz H. T. 1989. «Micronodular cirrhosis after thiabendazole». *Dig Dis Sci.*, vol. 34, p.938-941.
- Rumack B. H. 2002. «Acetaminophen-induced hepatotoxicity: the first 35 years». *J Toxicol Clin Toxicol.*, vol. 40, p. 3-20.
- Ryan D. E., Levin W. 1990. «Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450». *Pharmacol Ther.*, vol. 45, p. 153-239.
- Sanap M. N., Worthley L. I. G. 2002. «Neurologic complications of critical illness: Part I. Altered states of consciousness and metabolic encephalopathies». *Clin Care Resusc.*, vol. 4, p. 119-132.
- Sandmann S., Unger T. 1999. «L- and T-type calcium channel blockade-the efficacy of the calcium channel antagonist mibefradil». *J Clin Basic Cardiol.*, vol. 2, p. 187-201.
- Sartorius U., Schmitz, I., Krammer P.H. 2001. «Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis». *Chembiochem*, vol. 2, p.20-29.
- Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. 2006. «Apoptosis in liver disease». *Liver Int.*, vol. 26, p. 904-911.
- Schmeltz I., Tosk J., Williams G. M. 1978. «Comparison of the metabolic profiles of benzo(a)pyrene obtained from primary cell cultures and subcellular fractions derived from normal and methylcholanthrene induced rat liver». *Cancer Letters (Shannon, Irel)*, vol. 5, p. 81-89.
- Seglen P. O. 1976. «Preparation of isolated rat liver cells». *Methods Cell Biol.*, vol. 13: 29-83.
- Seiler C. A., Dufour J. F., Reichen J., Candinas D. 2006. «Transplantation hépatique 2006 : que doit savoir le médecin praticien ?». *Forum Med Suisse*, vol. 6, p. 312-318.
- Senior J. R. 2002. «Acetaminophen overview. Acetyl-para-aminophenol (APAP)», http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/slides/3882S1_03_Senior.pdf, (21 mars 2007)
- Shen C., Zhang G., Qiu H., Meng Q. 2006. «Acetaminophen-induced hepatotoxicity of gel entrapped rat hepatocytes in hollow fibers». *Chem Biol Interact.*, vol. 162, p. 53-61.
- Shi Y. 2002. «Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis». *Molecular Cell.*, vol 9, p.459-470.
- Sinclair JF, Szakacs JG, Wood SG, Kostrubsky VE, Jeffery EH, Wrighton SA, Bement WJ, Wright D and Sinclair PR. 2000. «Acetaminophen hepatotoxicity precipitated by short-term treatment of rats with ethanol and isopentanol: protection by triacetyloleandomycin». *Biochem Pharmacol.*, vol. 59, p. 445-454.

- Skandrani K., Richardet J. P., Duvoux C., Cherqui D., Zafrani E. S., Dhumeaux D. 1997. «Hepatic transplantation for severe dustopenia related to ingestion of thiabendazole». *Gastroenterol Clin Biol.*, vol 21, p. 623-625.
- Skerjanec A., Tam Y. K. 1995. «High-performance liquid chromatographic analysis of mibefradil in dog plasma and urine». *J Chromatograph B Biomed Appl.*, vol. 669, p. 377-82.
- Smith R. V., Acosta D., Rosazza J. P. 1977. «Cellular and microbial models in the investigation of mammalian metabolism of xenobiotics». *Adv Biochem Eng.*, vol. 5, p. 69-100.
- Sood G. K., Jones B. A. 2006. «Acute liver failure», <http://www.emedecine.com/med/topic990.htm>, (21 mars 2007).
- Sugihara N., Shimomichi K., Furuno K. 1997. «Cytotoxicity of food preservatives in cultured rat hepatocytes loaded with linolenic acid». *Toxicology*, vol. 120, p.29-36.
- Tagami A., Ohnishi H., Hugues R. D. 2003. «Increased serum soluble Fas in patients with acute liver failure due to paracetamol overdose». *Hepatogastroenterology*, vol. 50, p. 742-45.
- Tanne, J. 2006. «Paracetamol causes most liver failure in UK and US». *BMJ*, vol 332, no 7542, p. 628.
- Thedinga E., Ullrich A., Drechsler S., Niendorf R., Kob A., Runge D., Keuer A., Freund I., Lehmann M., Ehret R. 2007. «In vitro System for the prediction of hepatotoxic effects in primary hepatocytes». *ALTEX*, vol. 24, p. 22-34.
- Thomas S. H. L. 1993. «Paracetamol (acetaminophen) poisoning». *Pharmacol Ther.*, vol. 60, p. 91-120.
- Thomson A. B. R., Shaffer E. A. (éds). 2000. *First principles of gastroenterology : the basis of disease and an approach to management*, 3^e éd. Canadian Association of Gastroenterology, AstraZeneca Canada Inc., 662 p.
- Thomson A. B. R., Shaffer E. A. (éds). 2005. *Principes fondamentaux de gastro-entérologie États pathologiques et démarches thérapeutiques*, 5^e éd. Association canadienne de gastro-entérologie, AstraZeneca Inc., 972 p.
- Thornberry N. A., Lazebnik Y. 1998. «Caspases : enemies within». *Science*, vol. 281, no 5381, p. 1312-1316.
- Tinel M., Berson A., Vadrot N., Descatoire V., Grodet A., Feldmann G., Thénot J. P., Pessayre D. 2004. «Subluminal Fas stimulation increases the hepatotoxicity of acetaminophen and bromobenzene in mice». *Hepatology*, vol. 39, p. 655-666.
- Tocco D. J., Rosenblum C., Martin C. M., Robinson H. J. 1966. «Absorption, metabolism, and excretion of thiabendazole in man and laboratory animals». *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 9, p. 31-39.

- Toda C., Yasui T., Hashizuma K., Nagano H. 2000. «Effect of thiabendazole (TBZ) and glutathione (GSH) and GSH related enzymes in mice liver». *Yakugaku Zasshi.*, vol. 120, p. 787-94.
- Tomei L. D., Cope F. O. (Éds.). 1991. *The Molecular Basis of Cell Death, Current Communications in Cell and Molecular Biology*. Plainview (New York): Cold Spring Harbor Laboratory Press., 321 p.
- Tzivoni D., Kadr H., Braat S., Rutsch W., Ramires J. A., Kobrin I. 1997. «Efficacy of mibefradil compared with amlodipine in suppressing exercise-induced and daily silent ischemia: Results of a multicenter, placebo-controlled trial». *Circulation*, vol. 96, p. 2557-2564.
- Ullrich A., Berg C., Hengstler J. G., Runge D. 2007. «Use of a standardised and validated long-term human hepatocyte culture system for repetitive analyses of drugs: repeated administrations of acetaminophen reduces albumin and urea secretion». *ALTEX*, vol. 24, p. 35-40.
- Uotila M., Ruolahti E. Engwall E. 1981 «Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein». *J Immunol Methods.*, vol. 42, p. 11-15.
- Vaccarino A. L., Paul D., Mukherjee P. K., Rodriguez de Turco E. B., Marcheselli V. L., Xu L., Trudell M. L., Minguez J. M., Matia M. P., Sunkel C., Alvarez-Builla J., Barzan N. G. 2007. «Synthesis and in vivo evaluation of non-hepatotoxic acetaminophen analogs». *Bioorg Med Chem.*, vol. 15, p. 2206-15.
- Vacheret N. 1999. «Ultrastructure du parenchyme hépatique», <http://spiral.univ-lyon1.fr/polycop/HistologieFonctionnelleOrganes/AppareilDigestif/dig23rd.html>, (25 mars 2007).
- Valen G. 2003. «The basic biology of apoptosis and its implications for cardiac function and viability». *Ann Thorac Surg.*, vol. 75, p. S656-S660.
- Vanlemmens C., Miguet J. P., Bresson-Hadni S. 1996. «Transplantation hépatique chez l'adulte : indications et résultats». *Thérapeutique*, vol. 25, p. 1907-1988.
- Wandel C., Kim R. B., Guengerich P., Wood A.J. 2000. «Mibefradil is a P-glycoprotein substrate and a potent inhibitor of both P-glycoprotein and CYP3A in vitro». *Drug Metab Dispos.*, vol. 28, p. 895-98.
- Wang ZB, Liu YQ, Cui YF. 2005. «Pathways to caspase activation». *Cell Biol Int.*, vol. 29, p.489-496.
- Wan Po A. L., Zhang W. Y. 1998. «What lessons can be learnt from withdrawal of mibefradil from the market». *Lancet.*, vol. 351, p. 1829-1830.

Welker H. A., Weidekamm E., Houwing N., de Chatel R. 1998a. «Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mibefradil in hypertensive patients with varying degrees of renal insufficiency». *Pharmacology*, vol. 56, p. 297-307.

Welker H. A., Wiltshire H. Bullingham R. 1998b. «Clinical pharmacokinetics of mibefradil». *Clin Pharmacokinet* ., vol. 35, p. 405-423.

White E. 2006. «Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis». *Cell Death Differ.*, vol. 13, p. 1371-1377.

Wiltshire H. R., Harris S. R., Prior K. J., Kozlowski U. M., Worth E. 1992. «Metabolism of calcium antagonist Ro 40-5967: a case history of the use of diode-array u.v. spectroscopy and thermospray-mass spectrometry in the elucidation of a complex metabolic pathway». *Xenobiotica*, vol. 22, p. 837-857.

Wiltshire H. R., Sutton B. M., Heeps G., Betty A. M., Angus D. W., Madigan M. J., Sharp S. R. 1997a. «Metabolism of calcium antagonist, mibefradil (POSICOR, Ro 40-5967). Part II. Metabolism in hepatic microsomes from rat, marmoset, cynomolgus monkey, rabbit and man». *Xenobiotica*, vol. 27, p. 539-556.

Wiltshire H. R., Sutton B. M., Heeps G., Betty A. M., Angus D. W., Harris S. R., Worth E., Welker H. A. 1997b. «Metabolism of the calcium antagonist, mibefradil (POSICOR, Ro 40-5967). Part III. Comparative pharmacokinetics of mibefradil and its major metabolites in rat, marmoset, cynomolgus monkey and man». *Xenobiotica*, vol. 27, p. 557-571.

Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L., Dunlop, D. 1984. «Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis». *J Pathol.*, vol. 142, p. 67-77.

Xu D., Sorrell M. F., Casey C. A., Tuma D. J. 1992. «Impaired attachment of hepatocytes to extracellular matrix components after chronic ethanol administration». *Lab Invest.*, vol 67, p. 186-190.

Yagi K., Michibayashi N., Kurikawa N., Nakashima Y., Mizoguchi T., Harada A., Higashiyama S., Muranaka H., Kawase M. 1997. «Effectiveness of fructose-modified chitosan as scaffold for hepatocyte attachment». *Biol Pharm Bull.*, vol 20, p. 1290-1294.

Yin, X.-M. 2000. «Bid, a critical mediator for apoptosis induced by activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes». *J Mol Med.*, vol. 78, p. 203-11.

Yin X.-M., Dong Z. 2003. *Essentials of apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*. Totowa (New Jersey): Humana Press, 259 p.

Yomiya K. 2007. «Non-opioid analgesics in cancer pain». *Nippon Rinsko.*, vol. 65, p. 49-54.

Yoshida M., Inoue K., Sekiyama K., Koh I. 1996. «Favorable effect of new artificial liver support on survival of patients with fulminant hepatic failure». *Artif Organs.*, vol. 20, no 11, p. 1169-72.

Ziegler D. M. 1988. «Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities». *Drug Metabol Rev.*, vol. 19, p. 1-32.

Zornig M., Hueber A. O., Baum W., Evan G. 2001. «Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis». *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1551, p. F1-F37.

Zurlo J., Arterburn L. M. 1996. «Characterization of primary hepatocyte culture system for toxicological studies». *In vitro Cell Dev Biol.*, vol 32, p. 211-220.